

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2008年 3月 12日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 塩飽 邦憲 

所属機関名： 島根大学医学部

所属部署： 環境予防医学 職名： 教授

〒 693-8501
所在地： 島根県出雲市塩冶町89-1

電話： 0853-20-2169 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国西部における生活習慣病危険因子解明のための多目的コーホート研究

3. 成果の概要（100字程度）

寧夏医学院附属病院において労働者691人を対象に、国際糖尿病連盟による判定基準を用いて、メタボリックシンドロームの疫学調査を行った。BMI25以上の割合は、男性42%、女性13%であり、同年代の日本人男性28%、女性20%よりも男性で有意に高率、女性では低率であった。中国西部の男性労働者は日本人よりも肥満傾向にあった。メタボリックシンドローム有病率は男性23%、女性10%と男性で高率であることが明らかになった。今後、さらに対象者を拡大し、生活習慣病のコホート研究に発展させる予定である。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 塩飽邦憲 職名： 教授

所属機関： 島根大学医学部 部署： 環境予防医学

中国側研究者氏名： 宋 輝 職名： 教授

所属機関： 寧夏医学院 部署： 公衆衛生学部

中国西部における生活習慣病危険因子解明のための多目的コホート研究

研究者氏名	所属機関
塩飽邦憲	島根大学医学部環境予防医学・教授
宋 輝	寧夏医学院公衆衛生学部・教授

要 旨

寧夏医学院附属病院において労働者 691 人を対象に、国際糖尿病連盟による判定基準を用いて、メタボリックシンドロームの疫学調査を行った。BMI25 以上の割合は、男性 42%、女性 13%であり、同年代の日本人男性 28%、女性 20%よりも男性で有意に高率、女性では低率であった。中国西部の男性労働者は日本人よりも肥満傾向にあった。メタボリックシンドローム有病率は男性 23%、女性 10%と男性で高率であることが明らかになった。今後、さらに対象者を拡大し、生活習慣病のコホート研究に発展させる予定である。

Key Words

メタボリックシンドローム、肥満、コホート研究、疫学

はじめに

アジア地域では、著しい経済発展に伴って食糧事情や交通網が改善しつつあるため、肥満、肥満関連疾患（メタボリックシンドローム、2 型糖尿病）の増加が危惧されている¹⁾。内臓肥満を伴う耐糖能異常では、高中性脂肪血症、低 HDL コレステロール血症、高血圧を併発することが多く、耐糖能異常単独よりも循環器疾患の危険性が高まることから、世界保健機構 WHO では循環器疾患危険因子を併発した状態を「メタボリックシンドローム」と名付けている。アジア人の死因構造では、脳血管疾患が多く、虚血性心疾患が少ない特徴は維持されているが、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病の増加によって、大中血管の動脈硬化に起因する脳梗塞や心筋梗塞の増加の兆しが見られる²⁾。こうしたアジア人の疾病構造の特徴は、遺伝子多型、食生活、身体活動、社会関係などから説明されているが、実証的な研究は少ない。

中国における循環器疾患の死亡率は、日本に比べて 3 倍以上高い²⁾。1999 年に中国政府は経済的に立ち後れた西部の地域間格差を是正すべく開発プロジェクトを開始し、その対象地域である寧夏回族自治区でも、鉄道、水力・天然ガスなどのインフラ整備や産業開発が急ピッチで進められている。寧夏回族自治区では、南部に開発に取り残された貧困層が多く存在する反面、人口の急増する銀川市などの都市部では、身体活動の低下や食糧事情の改善によって循環器疾患が死因の一位となり、その基礎病変として糖尿病の増加が危惧されているが、実態の解明と対策は遅れている。

アジア人の肥満は、肥満度が白人と比較して低く、WHO の世界的な肥満基準である body mass index (BMI) 30 以上の割合は、欧米では 15-25%であるのに対し、北東アジアでは 2-6%である。また、アジア人では、同じ BMI でも体脂肪が多いことが報告され、2 型糖尿病有病率も欧米を上回っている。このようにアジア人の肥満関連疾患の特性は白人と大きく異なるが、予防対策や生活療法についてはエビデンスの多い欧米方式で行うことが多い。したがって、アジア人に効果的な対策樹立には、アジアでの実証的な研究が重要と考えられる。このため、寧夏医学院公衆衛生学部と共同で、中国での肥満関連疾患の実態と予防戦略確立のためのコホート研究プロジェクトを開始することにした。今回は、日中医学協会助成事業によりコホート研究のベースライン調査を行ったので、肥満および肥満関連疾患の実態について報告する。

対象と方法

寧夏回族自治区銀川市（人口 120 万人）在住の労働者 691 人を対象に、生活習慣病を対象としたコホート研究のベースライン調査を行った。寧夏医学院附属病院にて職場定期健診を受診した労働者（20 歳～60 歳）に対して、文書による承諾書を得て、生活習慣、現病歴、職場環境などに関する健康調査票の記入、絶食状態で体格測定、血液採取と生化学調査を行った。血液生化学検査は寧夏医学院附属病院で、オートアナライザーにより行った。ウエスト周囲径は、立位により臍部を測定した。2008 年 3 月までにデータ収集ができた対象者は 691 人であるが、5 月までに 2,000 人を調査することになっている。メタボリックシンドロームの判定基準は、中国人についてのウエスト周囲径を規定している国際糖尿病連盟のものを用いて、判定した（表 1）³⁾。

本研究を遂行するために寧夏医学院の宋教授は、2006 年 11 月に留学先のカナダ マックマスター大学から島根大学を訪れ、島根大学重点研究プロジェクトによる雲南市コホート研究について理解を深めた。塩飽は 2007 年 2 月に寧夏医学院を訪れ、本研究のデータ整理及び共同研究者と意見交換を行った。また、北京において中国栄養・食品衛生研究所を訪問し、中国全土の生活習慣病と栄養状態の資料収集、意見交換を行った。

表1 国際糖尿病連盟 (IDF)のメタボリックシンドローム診断基準 (2005)

- ・ 中心性肥満
 - BMI ≥ 30ならウエスト囲は不要
- ・ 上記に加えて、以下の4項目の2項目以上該当
 - 高中性脂肪血症(治療中または中性脂肪150 mg/dl以上)
 - 低HDLコレステロール血症(治療中または男40 mg/dl未満、女50 mg/dl未満)
 - 高血圧(治療中または血圧130/85 mmHg以上)
 - 高血糖(空腹時血糖100 mg/dl以上または診断された糖尿病)
- ・ ウエスト囲基準
 - ヨーロッパ人
 - ・ 男 94 cm以上
 - ・ 女 80 cm以上
 - 南アジア人
 - ・ 男 90 cm以上
 - ・ 女 80 cm以上
 - 中国人
 - ・ 男 90 cm以上
 - ・ 女 80 cm以上
 - 日本人
 - ・ 男 85 cm以上
 - ・ 女 90 cm以上

表2 対象者の性と職種

性	職種	20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	計
男性	現業	37(60.7%)	90(55.9)	62(41.1)	16(27.8)	205(47.8)
	事務管理	24(39.3)	71(44.1)	89(58.9)	42(72.4)	226(52.4)
	計	61	161	151	58	431
女性	現業	18(48.2)	57(48.7)	23(29.1)	7(28.0)	105(40.4)
	事務管理	21(53.8)	60(51.3)	56(70.9)	18(72.0)	155(59.6)
	計	39	117	79	25	260
男性	中学	0(0.0%)	35(21.7)	40(26.5)	22(37.9)	97(22.5)
	高校	9(14.8)	31(19.3)	29(19.2)	13(22.4)	82(19.0)
	短大	28(45.9)	48(29.8)	38(25.2)	15(25.9)	129(29.9)
	大学以上	24(39.3)	47(29.2)	44(29.1)	8(13.8)	123(28.5)
	計	51	161	151	58	431
女性	中学	0(0.0)	22(18.8)	6(7.6)	9(36.0)	37(14.2)
	高校	5(12.8)	14(12.0)	24(30.4)	3(12.0)	46(17.7)
	短大	19(48.7)	44(37.6)	33(41.8)	5(20.0)	101(38.8)
	大学以上	15(38.5)	37(31.7)	16(20.3)	8(32.0)	76(29.2)
	計	39	117	79	25	260

結果と考察

1. 対象者の特性

対象者は、男性 431 人（平均 39.7 歳）、女性 260 人（平均 38.2 歳）で、30-40 歳代が多かった。事業所規模は 50 人未満の小事業場から 500 人以上の大事業場にわたっていた。職種では、男性では現業職と事務管理職がほぼ同数であったが、女性では現業職より事務管理職が多かった。男女とも加齢と共に現業職が減少し、事務管理職が増加した。生活習慣や生活習慣病に関連のある教育歴は、短大以上の高等教育を受けた人が男女とも半数を占め、女性および若齢者でその割合が高かった（表 2）。

2. 対象者の生活習慣

循環器疾患の発症と関連の深い喫煙習慣は、男性 58%、女性 2%で、男性では 40 歳代で最も高く、女性では 20 歳代で最も高率であった。男性の喫煙率は日本よりも高率を示した。飲酒習慣は、男性 73%、女性 15%で、男性では 30 歳代で最も高く、女性では 20 歳代で最も高率であった。週 2 回以上の運動習慣については、男性 43%、女性 41%で、男女とも 50 歳代で最も高率であった。日本の同年代労働者（男性 14%、女性 26%）⁴⁾より運動習慣の実行率は高率であり、若齢期から運動習慣を実践していた。

表3 生活習慣

生活習慣	性		20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	計
喫煙	男性	現在	26(42.6%)	98(60.9)	97(64.2)	29(50.5)	250(58.0)
		過去	1(1.6)	11(6.8)	14(9.3)	7(12.1)	33(7.7)
		なし	34(55.7)	52(32.3)	40(26.5)	22(37.9)	148(34.3)
	女性	現在	2(5.1)	3(2.6)	1(1.3)	0(0.0)	6(2.3)
		なし	37(64.9)	114(97.4)	78(98.7)	25(100.0)	254(97.7)
飲酒	男性	現在	45(73.8)	126(78.8)	112(74.2)	31(53.4)	314(73.0)
		過去	3(4.3)	6(3.8)	8(5.3)	6(10.3)	23(5.3)
		なし	13(21.3)	28(17.5)	31(20.5)	21(36.2)	93(21.6)
	女性	現在	7(17.9)	14(12.0)	13(16.5)	4(16.0)	38(14.6)
		過去	2(5.1)	3(2.6)	3(3.8)	1(4.0)	9(3.5)
		なし	30(76.9)	100(85.5)	63(79.7)	20(80.0)	213(81.9)
運動	男性	あり	28(45.9)	57(35.4)	62(41.1)	36(62.1)	183(42.5)
	女性	あり	16(41.0)	42(35.9)	37(46.8)	12(48.0)	107(41.2)

運動: 週2回以上の運動習慣

3. 肥満とメタボリックシンドローム

BMIは、男性 24.4 ± 3.2 、女性 21.9 ± 2.7 、ウエスト周囲径は 86.9 ± 8.8 cm、女性 73.7 ± 7.7 cm であった。BMI25以上の割合は、男性42%、女性13%であり、同年代の日本人男性28%、女性20%⁴⁾よりも男性で有意に高率、女性では低率であった。ウエスト周囲径についても同様の傾向を示した。

国際糖尿病連盟は、中国人の肥満についてはウエスト周囲径で男性90 cm以上、女性80 cm以上または(BMI)25以上と規定している(表1)³⁾。日本内科学会等による内臓肥満の定義は、CTによる内臓肥満面積100 cm²以上に対応するウエスト周囲径(男性85 cm以上、女性90 cm以上)⁵⁾としているため、単純に比較することができない。本研究では、ウエスト周囲径で男性90 cm以上、女性80 cm以上とした。内臓肥満は男性では39%、女性24%であり、男女ともに加齢とともに内臓肥満の割合は増加したが、男性ではその増加は緩やかであった。女性では、閉経後の50歳代で顕著に増加した(表3)。

肥満関連の循環器疾患危険因子数は国際糖尿病連盟に基づいて算出した³⁾。これには内臓肥満は含まれておらず、高中性脂肪血症、低HDLコレステロール血症、高血圧、高血糖の4つの危険因子数を加算した。日本の基準とは、高血糖(100 mg/dl以上)および脂質異常(高中性脂肪血症と低HDLコレステロール血症を別々に加算)について異なっている。男性では30歳代から高率であり、女性に閉経後の50歳代で顕著に増加した(表4)。

国際糖尿病連盟のメタボリックシンドローム診断基準は、内臓肥満のある者の内で、危険因子数を2つ以上の者としている(表3)³⁾。メタボリックシンドロームは男性では23%、女性10%であり、男女ともに加齢とともに割合が増加したが、男性では30歳代より増加した。女性では、40歳代より増加し、閉経後の50歳代で顕著に増加した(表5)。日本人では、β細胞からのインスリン分泌の少なさやインスリン抵抗性の強さが寄与していると考えられている。

4. 本研究の意義と限界

白人と異なる遺伝と生活習慣を有する日本人、韓国人、モンゴル人と同様に⁴⁾、中国人も軽度な肥満の割に、代謝異常の多いことが明らかになった。食習慣では、韓国人が最も高炭水化物、低脂肪であり、モンゴル人は高脂肪、低炭水化物であり、日本人と中国人はその中間であった。中国人の摂取エネルギー当たりの炭水化物摂取割合は日本人と同様であるが、脂肪の摂取割合は多かった(表7)⁶⁾。高炭水化物摂取が高中性脂肪血症に寄与していることが明らかになっているため、こうした食習慣が、中国人の脂質異常の高さに関連しているものとする⁷⁾。しかし、本研究は断面研究であり、今後、同一研究プロトコールに基づいた日本、中国、韓国、モンゴルでのコホート研究の実施が重要と考える。

表4 内臓肥満とメタボリックシンドロームの有病率

性		20歳代	30歳代	40歳代	50歳代	計
男性	正常	45(73.8%)	107(66.5)	79(52.3)	30(51.7)	261(60.6)
	肥満	16(26.2)	54(33.5)	72(47.7)	28(48.3)	170(39.4)
	MSなし	59(96.7%)	127(78.9)	105(69.5)	41(70.7)	332(77.0)
	MSあり	2(3.3)	34(21.1)	48(30.5)	17(29.3)	99(23.0)
	計	61	161	151	58	431
女性	正常	35(89.7)	98(82.1)	55(69.6)	11(44.0)	197(75.8)
	肥満	4(10.3)	21(17.9)	24(30.4)	14(56.0)	63(24.2)
	MSなし	37(94.9)	112(95.7)	69(87.3)	15(60.0)	233(89.6)
	MSあり	2(5.1)	5(4.3)	10(12.7)	10(40.0)	27(10.4)
	計	39	117	79	25	260

肥満 ウエスト周囲径男 90 cm以上、女 80 cm以上、MS メタボリックシンドローム。

表5 メタボリックシンドローム危険因子数

性	危険因子数	20	30	40	50	計
男性	0	25(41.0%)	37(23.0)	31(20.7)	9(15.5)	102(23.7)
	1	27(44.3)	56(34.8)	40(26.7)	21(36.2)	144(33.5)
	2	7(11.5)	43(26.7)	49(32.7)	18(31.0)	117(27.2)
	3	2(3.3)	23(14.3)	25(16.7)	7(12.1)	57(13.3)
	4	0(0.0)	2(1.2)	5(3.3)	3(5.2)	10(2.3)
	計	61	161	150	58	430
女性	0	28(71.8)	63(54.3)	35(44.3)	7(28.0)	133(51.4)
	1	6(20.5)	33(28.4)	26(32.9)	5(20.0)	72(27.8)
	2	2(5.1)	17(14.7)	13(16.5)	10(40.0)	42(16.2)
	3	0(0.0)	1(0.9)	5(6.3)	3(12.0)	9(3.5)
	4	1(2.6)	2(1.7)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.2)
	計	39	116	79	25	259

表6 北東アジア諸国の主要栄養素摂取

国	蛋白質	脂肪	炭水化物	
U.S.A.	15%	40%	45%	
日本 (2000)	73 g	45 g	259 g	
	16%	27%	57%	
中国 (2002)	66 g	76 g	321 g	
	12%	31%	57%	
韓国 (1995)	73 g	39 g	295 g	
	16%	19%	65%	
モンゴル (2002)				
	都市住民	78 g	63 g	230 g
		17%	32%	51%
	遊牧民	65 g	84 g	172 g
	15%	44%	40%	

本研究の実施により、寧夏医学院への疫学研究の技術移転により社会ニーズ志向の研究戦略、疫学研究者の育成に寄与できた。また、日本と中国の遺伝と生活習慣を踏まえた北東アジア人に適合した肥満関連疾患の予防戦略確立に寄与が期待される。

参考文献

1. WHO/IASO/IOTF. The Asia-Pacific Perspective: Redefining Obesity and its Treatment. Health Communications Australia Pty Ltd, 2000.
2. WHO: WHO Global InfoBase Online. 2002 http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/web/
3. International Diabetes Federation. IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf
4. Shiwaku K, *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome using the modified ATP III definitions for workers in Japan, Korea and Mongolia. J Occup Health 47: 126-135, 2005
5. Matsuzawa Y. Metabolic syndrome-definition and diagnostic criteria in Japan. J Atheroscler Thromb 12: 301, 2005
6. 王陀徳編. 中国居民栄養健康状況調査報告書 2002. 人民衛生出版社, 北京, 2005
7. Shiwaku K, *et al.* Traditional Japanese dietary basics: a solution for modern health issues? Lancet 363: 1737-1738, 2004

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 14日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 杉山 広 

所属機関名： 国立感染症研究所

所属部署： 寄生動物部 職名： 主任研究官
〒162-8640

所在地： 東京都新宿区戸山1-23-1

電話： 03-5285-1111 内線： 2734

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

アジア産人体寄生性全種肺吸虫に対応する肺吸虫症血清診断キットの開発

3. 成果の概要（100字程度）

免疫クロマトグラフィー法に基づく診断キットを作製し、ウエステルマン肺吸虫症と宮崎肺吸虫症の患者血清で検討したところ、診断抗原の由来種と患者の原因種が一致した場合に、的確な診断結果が得られる事が明らかとなった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 杉山 広 職名： 主任研究官

所属機関： 国立感染症研究所 部署： 寄生動物部

中国側研究者氏名： 銭 宝珍 職名： 教授

所属機関： 浙江省医学科学院 部署： 生物工程研究所

アジア産人体寄生性全種肺吸虫に対応する肺吸虫症血清診断キットの開発

研究者氏名	杉山 広
所属機関	国立感染症研究所寄生動物部 主任研究官
共同研究者名	銭 宝珍
所属機関	浙江省医学科学院生物工程研究所 教授

要 旨

肺吸虫症の免疫血清診断を目的に、免疫クロマトグラフィー法に基づく診断キットを作製し、本邦の肺吸虫症患者（ウェステルマン肺吸虫症と宮崎肺吸虫症）に適用可能であるか検討した。その結果、キットの作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症患者の原因種とが一致した場合には、的確な診断結果が得られる事が明らかとなった。一方、抗原の由来種と肺吸虫症の原因種とが異なる（異種の抗原で診断した）場合には、診断結果が一定しなかった。この場合、抽出粗抗原に替えてES抗原を用いると、非特異的な反応が減衰して診断の特異性が上昇した。またプロテインAが抗IgGに替わる検出プローブとして使用できる事が明らかとなり、動物へのキット利用の道が開けた。現在、複数種に由来するES抗原と、更にリコンビナント・タンパク（中性システインプロテアーゼ）を調整中で、これらを用いて新たな診断用キットを作製する作業を進めている。また浙江省（ウェステルマン肺吸虫）と湖北省（スクリアピン肺吸虫）の流行地で、新規作製のキットも活用した疫学的調査を実施し、肺吸虫と肺吸虫症に関する総括的検討を進める予定になっている。

Key Words 肺吸虫, 免疫血清診断, 免疫クロマトグラフィー法, 金コロイド標識, 人獣共通寄生蠕虫症

緒 言:

肺吸虫症は重要な人獣共通寄生蠕虫症で、淡水産のカニを生や不完全な加熱で食べると云う伝統的な食文化を背景に発生する。アジアの諸国では、いくつかの種類が人体寄生の原因となっている。特に日本と中国では、ウェステルマン肺吸虫が重要な原因虫とされる。これとは別種の宮崎肺吸虫（日本に分布）やスクリアピン肺吸虫（中国に分布）も重要な人体寄生種となる。肺吸虫症の免疫血清診断には、従来から種々の手技が適用されてきた。本研究の中国側・共同研究者である銭らは、免疫クロマトグラフィー法に基づくキットを作製し、既に肺吸虫症の診断を行なっている[1, 2]。ウェステルマン肺吸虫の成虫抗原を用いたこのキット（以下、従来型キットと呼ぶ）は、皮内反応に準ずる簡便さ（迅速さ）を有する（反応自体は5分以内に終了）。検出感度は98%と高く、特異性は95%を示す。この様に優秀なキットではあるが、他種肺吸虫の感染が的確に診断できるかは、検討されてこなかった。

そこで本研究では、先ずこの従来型キットが、本邦の肺吸虫症患者（ウェステルマン肺吸虫症と宮崎肺吸虫症）の診断に適用可能であるかを調べた。次に、使用抗原を替えた新たなキット（以下、改良型キットと呼ぶ）を作製し、その診断能力を評価した。また動物へのキット応用を顧慮し、プロテインAが抗IgGに替わる検出プローブとして使用できるかを調べた。リコンビナント抗原の使用も視野に入れて、分子生物学的な検討も進めた。以上のような実験室での検討に加えて、浙江省と湖北省の流行地に出掛け、肺吸虫症に関する疫学情報の収集に努めた。得られた成果を併せて報告する。

材料と方法：

1) 抗原の調整と改良型キットの作製

和歌山県産のサワガニから分離した宮崎肺吸虫のメタセルカリアをラットに感染させ、2ヶ月半に剖検して成虫を回収した。またタイ産のヒロクチ肺吸虫メタセルカリアをネコに感染させ、30ヵ月後に剖検して成虫を回収した。回収した成虫の一部は、滅菌生理食塩水で洗浄後、液体培地 RPMI1640 で3時間培養し(37℃、5%CO₂)、ES 抗原 (Excretory Secretary Antigen) を調整した。残りの成虫は、滅菌生理食塩水で洗浄後、リン酸緩衝生理的食塩水 (PBS, 0.01M, pH7.2) を加えてホモゲナイズし、抽出粗抗原を調整した。各抗原のタンパク量を測定し、至適濃度となるように PBS で希釈、あるいは遠心濃縮 (ビバスピ 20、分子量 5,000、ビバサイエンス) して、キット・デバイスのニトロセルロース膜面の中央部にスポットした。

2) 供試血清

当研究室で診断した肺吸虫症患者に由来する血清 5 検体 (Pw225, Pw457, Pm339, Pm467, Pm421) と、当研究室で実験感染させて得た動物由来の血清 6 検体 (PwCat-01, -03, -04, -05, -10, PwDog-01) を代表的な試料として用い、キットの診断能力を評価した。

3) キットの評価

各キットを用いた反応の後、キット・デバイスのニトロセルロース膜面を肉眼的に観察し、赤色スポットの発色程度に応じて陽性、弱陽性、陰性の3段階に分けて、供試血清の反応性を表現した。また、プロテイン A (浙江医学科学院製) を既報 [1] に従い金コロイド (直径 20nm) で標識し、これが抗ヒト IgG に代替して、抗原抗体結合物を検出するプローブになるかを調べた。

4) リコンビナント抗原作製の試み

ウエステルマン肺吸虫のメタセルカリアに由来する (カテプシン L タイプの) 中性システインプロテアーゼに注目し、cDNA の配列 (D21124) [3] を基にプライマーを作製した (フォワード: 5' -GGGAATTC TCGACTGCCGAAAC -3' およびリバース: 5' -CCCTGCAGTTGATTCCACACGTG-3')。これらのプライマーは、元の配列を少し改変させ、*EcoRI* (GAATTC) あるいは *PstI* (CTGCAG) の認識配列を夫々に挿入し、プラスミド・ベクター (pMal-c2, NEB) への強制クローニングが可能となるよう工夫した。次に、ウエステルマン肺吸虫 (2 倍体型) 成虫から調整した poly(A)⁺RNA をテンプレートとして、上記のプライマーペアを用いて RT-PCR を行った。得られた予想サイズの産物を上述のベクターにクローニングし、塩基配列を解読すると共に、大腸菌 (XL1-Blue) にトランスフェクトし、IPTG でインダクションを掛け、リコンビナント・タンパクを産生させた。

5) 肺吸虫症の流行状況に関する情報の収集

ウエステルマン肺吸虫症の流行地である浙江省寧波市に出掛け、寧波市疾病予防控センターの葉麗萍部長に面談し、当該地の肺吸虫症について、流行状況や病態像に関する資料の提示を受けて討議を行なった。スクリアピン肺吸虫症の流行地である湖北省十堰市にも出掛け、鄖陽医学院寄生虫学教室の朱名肚教授から同様に情報を収集した。

結果：

1) 従来型キット (ウエステルマン肺吸虫抗原) の評価

本邦の肺吸虫症患者の血清を用いて、従来型キットを評価した。その結果、ウエステルマン肺吸虫に感染した患者の血清に対しては、いずれも陽性を示す事が分かった。一方、宮崎肺吸虫の患者血清に対して

は、陽性となる場合 (Pm421)、弱陽性となる場合 (Pm467)、更に陰性となる場合 (Pm339) が認められた (表)。

2) 改良型キット (宮崎およびヒロクチ肺吸虫抗原) の評価

宮崎肺吸虫抗原を用いて作製した改良型キットは、宮崎肺吸虫の患者血清に対して、総て陽性を示した。一方、ウエステルマン肺吸虫の患者血清に対しては、弱陽性となる場合 (Pw225) と陰性となる場合 (Pw457) が認められた。

ヒロクチ肺吸虫抗原 (抽出粗抗原) を用いて作製された改良型キットは、ヒロクチ肺吸虫に感染した患者 (タイ人) の血清に対して常に陽性を示した (銭ら, 未発表)。そこで、ウエステルマン肺吸虫に感染した患者の血清を用いて、この改良型キット (ヒロクチ肺吸虫抗原) を評価した。その結果、陽性となる場合 (Pw225) と陰性となる場合 (Pw457) が認められた。そこで、ES 抗原 (ヒロクチ肺吸虫) を調整して新たに改良型キットを作製し、検討を加えた。その結果、粗抗原 (ヒロクチ肺吸虫) のキットで陰性であった血清 (Pw457) は、同じく陰性に留まる事が分かった。一方、陽性を示した血清 (Pw225) は反応が弱まり、弱陽性となる事が分かった。

3) プロテイン A を用いたキットの評価と動物の診断への応用

従来型キットで検出された患者血清 (Pw225 と Pw457) の反応が、抗ヒト IgG ではなく、プロテイン A をプローブにしても検出できるかを調べた。その結果、ウエステルマン肺吸虫症の患者血清は変わらず陽性を示し、プロテイン A をプローブとしても患者の診断が可能である事が分かった。

ウエステルマン肺吸虫感染ネコおよびイヌの血清に対して、従来型キットが陽性を示すかを調べた。プローブにはプロテイン A を用いた。その結果、ネコおよびイヌの感染血清は、すべて陽性となる事が明らかとなった (感染前血清はいずれも陰性)。

4) リコンビナント・タンパクの調整

ウエステルマン肺吸虫の成虫から調整した poly(A)⁺RNA をテンプレートとし、中性システインプロテアーゼを標的に RT-PCR を行なった。その結果、予想サイズの産物 (546bp: プライマー部分を除くと 500bp) が増幅された。この RT-PCR 産物をベクターにクローニングし、遺伝子配列を解読して既知の中性システインプロテアーゼの配列 (D21124) と比較した。その結果、シミラリティーは核酸レベルで 98.0% である事が分かった。このクローンを大腸菌にトランスフェクトさせ、インダクションを掛けた。その結果、約 70kDa のリコンビナント・中性システインプロテアーゼが発現した。現在、リコンビナント・タンパクの大量発現と精製を進めている。

5) 肺吸虫症の流行情況調査

浙江省寧波市の流行地 (ウエステルマン肺吸虫) において、従来型キットなどにより検出された肺吸虫症患者は、2000 年 - 2004 年の 5 年間で 369 名 (1 年間に 60-80 名) に上った。患者に認められた臨床症状は発熱と呼吸器症状が主で、皮下結節を認めるなどの異所寄生例・迷入例は検出されなかった。

湖北省十堰市の流行地 (スクリアピン肺吸虫) においては、この 5 年間に見出された肺吸虫症患者は 108

血清	抗原別のキット反応性				
	PwH ¹⁾	PmH	PhH	PhES	PwH ³⁾
Pw225	++ ²⁾	+	++	+	++
Pw457	++	-	-	-	++
Pm339	-	++	ND ⁴⁾	ND	ND
Pm467	+	++	ND	ND	ND
Pm421	++	++	ND	ND	ND

表. 各種抗原を用いて作製したキットの反応性評価 : 患者血清を用いての検討

- 1) PwH: ウエステルマン肺吸虫抽出粗抗原, PmH: 宮崎肺吸虫抽出粗抗原, PhH: ヒロクチ肺吸虫抽出粗抗原, PhES: ヒロクチ肺吸虫 ES 抗原
- 2) ++: 陽性, +: 弱陽性, -: 陰性
- 3) 金コロイド標識プロテイン A をプローブに用いた評価結果, 他は金コロイド標識ヒト IgG をプローブとした
- 4) ND: 検討せず

名であった。このうち 38 例が呼吸器症状のみを呈したが、36 例で移動性皮下結節を、16 例に腹部症状・病変（臍周囲の疼痛、肝腫大、腹水貯留など）を、7 例に神経症状を認めた。スクリアピン肺吸虫では異所寄生例・迷入例が問題で、簡便で正確な免疫血清学的診断法の導入・確立が重要である事を痛感した。現在、当地で得たスクリアピン肺吸虫メタセルカリアをネコに感染させ、すでに糞便内排卵を確認した。成虫を回収して抗原を調整し、改良型キット（スクリアピン肺吸虫）を作製する予定である。

考 察：

本研究の結果、従来型キット（ウェステルマン肺吸虫抗原を使用）[1, 2]で、本邦のウェステルマン肺吸虫症患者が的確に診断される事が分かった。また宮崎肺吸虫抗原を用いて作製した改良型キットで、宮崎肺吸虫症患者が的確に診断された。すなわち、キット作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症患者の原因種とが一致した場合に、的確な診断結果が得られる事が明らかとなった。注意が必要なのは複数種の肺吸虫が人体寄生の原因となる地域で、この場合は原因種を網羅したキットの作製が必要になると考えられた。

一方で、キットの作製に用いた抗原の由来種と肺吸虫症の原因種とが異なる（異種の抗原で診断した）場合は、結果が一定しなかった。この場合、抽出粗抗原に替えて ES 抗原を用いると、非特異的な反応が減衰する事をヒロクチ肺吸虫で確認した。ES 抗原の使用により診断の特異性が上昇する事は、マイクロ ELISA の系などで既に報告されている[4]が、免疫クロマトグラフィー法を応用したキットでも同様の結果が得られた。現在、ウェステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫から ES 抗原を調整しているので、これを用いた改良型キットを作製し、診断の種特異性が高くなる事を実証する予定である。また、リコンビナント・中性システインプロテアーゼを調整中であり、これを抗原とするキットを作製して、診断に活用したいと考えている。

肺吸虫のネコやイヌへの感染性は高く、これらの動物が終宿主として野外で生活環を維持している。このような終宿主動物の診断には、抗ヒト IgG に替えて、動物の IgG に結合するプロテイン A の使用が必要となる。そこで本研究では、金コロイドで標識したプロテイン A を準備し、ウェステルマン肺吸虫に実験感染させたネコとイヌの血清を用いて、従来型キットで診断が可能か検討した。その結果、動物の肺吸虫感染も診断できる事が分かった。このプローブで、肺吸虫症患者も同様に診断できた。多種類の動物を同時に対象とした検討には、金コロイド標識プロテイン A を用いるキットの使用が、有用と考えられた。

本研究で得られた成績を礎に、他の研究財団（ヒューマンサイエンス振興財団、平成 19 年度）に対して、外国の研究機関（浙江省医学科学院・生物工程研究所）への委託事業の申請を行なったところ、採択の運びとなった。研究計画としては、診断キットを多数作製し、これを用いて浙江省（ウェステルマン肺吸虫）と湖北省（スクリアピン肺吸虫）の流行地で、各 500 人以上の住民と多数の動物を対象に検査を実施する予定である。肺吸虫と肺吸虫症に関する知見を総括的に取りまとめたい。この様な研究活動を行なう事で、当該分野での技術提携と国際協力が一層推進されるものと考えている。

参考文献：

1. 干小仙他：肺吸虫抗体快速検測試剤益（金標滲濾法）研制和応用：中国人獣共患病学報，21:988-990，2005
2. 錢宝珍他：肺吸虫病金標滲濾試剤益（DIGFA-Kit）的現場初步応用：中国人獣共患病学報，22:99，2006
3. Yamamoto M et al.: Cloning of a cDNA encoding a neutral thiol protease from *Paragonimus westermani* metacercariae: Molecular and Biochemical Parasitology, 64:345-348, 1994
4. Maleewong W et al.: Excretory-secretory antigenic components of *Paragonimus heterotremus* recognized by infected human sera: Journal of Clinical Microbiology, 30:2077-2079, 1992

作成日：2007年3月14日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 横山 耕治  

所属機関名： 国立大学法人 千葉大学

所属部署： 真菌医学研究センター 職名： 助教授
〒 260-8673

所在地： 千葉市中央区亥鼻1-8-1

電話： 043-226-2789 内線： _____

1. 助成金額： 800,000 円

2. 研究テーマ

調査・共同研究助成 「中国東北部における真菌感染症調査および拠点形成」

3. 成果の概要（100字程度）

吉林大学白求恩基礎医学院，王麗教授との共同研究により中国東北部の真菌感染に係わる研究拠点を形成することができ，吉林大学第一医院における老年患者真菌感染の実情を調査することができた。さらに，真菌感染原因菌の疫学ならびに生態調査に欠かせない株間特異性を調べるSSR-PCRの条件設定をする事ができた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 横山 耕治 職名： 助教授

所属機関： 国立大学法人 千葉大学 部署： 真菌医学研究センター

中国側研究者氏名： 王 麗 職名： 教授

所属機関： 吉林大学 部署： 白求恩基礎医学院

中国東北部における真菌感染症調査および拠点形成

研究者氏名	横山耕治
所属機関	国立大学法人 千葉大学 真菌医学研究センター・助教授
中国側共同研究者	王 麗
所属機関	吉林大学 白求恩基礎医学院・教授

要旨

真菌症は、輸入真菌症を除き日和見感染に依ることがほとんどなために、注目を集める機会が少ない。そのために、真菌感染の実態は、ほとんど調査されていない。従って、中国東北部長春に拠点を形成し、真菌感染症の調査を行い、共同研究を実施した。基礎疾患として、気管支炎、肺気腫、肺ガン、糖尿病、脳血管病、胆管結石、胸腺炎、心血管病など老年患者の呼吸器系への真菌感染を調べた結果、72検体中63株(93.1%)分離することができた。原因菌として *Candida albicans* (57.73%), *Candida glabrata* (14.94%), *Candida tropicalis* (7.46%), *Candida krusei* (7.46%) そして、*Aspergillus* (13.43%) であった。老人の罹患率は極めて高いように思われた。この結果は、中国老年学雑誌第26巻、(2006年)に掲載された。

真菌症の疫学研究には、原因菌の疫学的特徴を明確にして原因菌の由来や感染経路を明らかにしなければならない。これらの研究のために、DNAの繰り返し配列を利用してPCRを行い、増幅されたDNA断片の様式から原因菌株固有の特徴を調べるSSR-PCR(Simple sequence repeat-PCR)法がある。このPCRの適正条件を直交計画法により明らかにした。この結果は、日本医真菌学会(2006年)に発表し、吉林大学学報第32巻第6期に掲載された。

Key Words

真菌症、病原真菌、老年患者、SSR-PCR、適正PCR条件

緒言:

真菌症原因菌には、399種が登録されており、その中で49種程度が一般に見受けられ病原真菌である。この数字は意外に少ないが、中国では新たな真菌症とその原因菌が見いだされる事がある。広い中国においては真菌感染症の実態は未だに明らかにされておらず、真菌感染症の調査は中国と日本にとって重要課題の一つである。さらに、真菌の生態調査が加わればより意義のある研究となる。従って、中国での真菌症調査と真菌生態調査のための拠点形成は欠かすことができない。

真菌症の多くは、日和見感染を引き起こす真菌が原因であり、宿主であるヒトの免疫低下が誘因となっている。現代医療の進歩に伴い、抗生物質の多用、抗ガン剤の使用による免疫低下、ステロイドホルモンの使用に伴う免疫低下、エイズウイルス感染による免疫不全など、真菌感染の機会は増えている。特に老年患者の真菌感染が起りやすく重篤になる傾向が予想される。

一方、真菌症原因菌の感染経路や由来、地域特異性などの疫学調査、生態調査のためには分離菌の特性を明らかにして区別することが必要である。この株の特性を調べる方法に、マイクロサテライト (micro-satellite) と呼ばれるDNAの縦繰り返し配列 (STRs ; short tandem repeats), 単純配列繰り返し配列 (SSR; simple sequence repeats), などを利用して、PCRを行い増幅されてくる長さの違いによるDNA断片の分布様式から

分離株の型別認識を行う方法が行われている。しかし、まだ確立された方法は無いため、試行錯誤の状況である。そこで我々は、SSR-PCRの適正条件を直交計画法により明らかにした。

対象と方法:

吉林大学第一病院入院患者、67例、男63例、女4例、年齢63~92歳、平均年齢77.5歳、入院日数12~72日、平均22.5日。

真菌症の診断は、検体の検鏡、培養、臨床状況を総合して行った。真菌の分離と同定は、検体をPDA(potato dextrose agar)に培養し、分離後、公簿上の真菌は、37℃で、菌糸状真菌は、28℃で培養し、顕微鏡による観察とコロニーの色形状、により同定を行い、酵母状真菌は酵母判定用培地のコロニーの色と形状により同定した。

SSR-PCRによる株認識のためのPCR条件の最適化については、*Aspergillus fumigatus* JLMR 0542株を用い、table1, 2の条件でPCRを行った。

結果:

老年患者呼吸器系真菌感染の調査および臨床研究

表1 真菌感染患者の原発疾病分布

原発疾病	n	構成比 (%)
慢性気管支炎急性発作、肺部感染、肺気腫	42	62.69
肺癌	5	7.46
糖尿病	9	13.43
脳血管病	6	8.96
胆管結石、膵腺炎	3	4.48
心血管病	2	2.99

真菌感染患者の原発疾患は、表1に示した。

慢性気管支炎急性発作、肺部感染、肺気腫 42例、肺ガン 5例、糖尿病 9例、脳血管病 6例、胆管結石、胸腺炎 3例、心血管病 2例であった。

表2 抗生薬使用状況

抗生薬	n	平均用药	平均用药	構成比 (%)
		天数 (d)	剂量 (g/d)	
头孢哌酮 舒巴坦钠	23	8.5	6.8	34.33
头孢三嗪	7	6.7	3.0	10.45
头孢噻肟	6	4.5	4.0	8.96
头孢拉定	5	7.7	4.8	7.46
头孢米诺钠	4	4.5	3.0	5.97
亚胺培南	3	3.5	2.0	4.48
头孢他啶	3	5.5	2.6	4.48
氧氟沙星	9	12.5	0.4	13.43
哌拉西林钠他唑巴坦钠	7	7.5	5.62	10.45

表2は、抗生物質の使用状況を示した。

表3 真菌菌株構成

菌種	菌株数	構成比 (%)
白色念珠菌	36	53.73
光滑念珠菌	10	14.93
热带念珠菌	5	7.46
克柔念珠菌	5	7.46
其他念珠菌	1	1.49
丝孢酵母菌	1	1.49
烟曲霉菌	6	8.96
构巢曲霉菌	1	1.49
黄曲霉菌	1	1.49
土曲霉菌	1	1.49

表3には、原因菌の構成を示した。

Candida albicans (57.73%),
Candida glabrata (14.94%),
Candida tropicalis (7.46%),
Candida krusei (7.46%),
 その他の *Candida* (1.49%),
Trichosporon (1.14%),
Aspergillus fumigatus (8.96%),
Aspergillus nidulans (1.49%),
Aspergillus flavus (1.49%),
Aspergillus terreus (1.49%) であった。

直交計画法による SSR-PCR の反応条件の最適化

Tab. 1 The factors and their levels in orthogonal design

Level	Taq DNA polymerase (λ_B/U)	Template ($\rho_B/mg \cdot L^{-1}$)	dNTP ($c_B/mol \cdot L^{-1}$)	Primer ($c_B/mol \cdot L^{-1}$)
A	0.5	10	150	0.25
B	1.0	20	200	0.50
C	2.0	30	250	1.00

Tab. 2 Orthogonal design with L9(3⁴)

Group	Taq DNA polymerase (λ_B/U)	Template ($\rho_B/mg \cdot L^{-1}$)	dNTP ($c_B/mol \cdot L^{-1}$)	Primer ($c_B/\mu mol \cdot L^{-1}$)	Degree
1	A (0.5)	A (10)	A (150)	A (0.25)	1
2	A	B (20)	B (200)	B (0.50)	3
3	A	C (30)	C (250)	C (1.00)	3
4	B (1.0)	A	B	C	3
5	B	B	C	A	4
6	B	C	A	B	6
7	C (2.0)	A	C	B	2
8	C	B	A	C	4
9	C	C	B	A	5
K_1	7	6	11	10	
K_2	13	11	11	11	
K_3	11	14	9	10	
$k_1 = K_1/3$	2.33	2.00	3.67	3.33	$\Sigma_{degree} = 31$
$k_2 = K_2/3$	4.33	3.67	3.67	3.67	
$k_3 = K_3/3$	3.67	4.67	3.00	3.33	
R	2.00	2.67	0.67	0.34	

DNA 合成酵素の濃度, 鋳型 DNA 濃度, ヌクレオチド三リン酸の濃度, プライマー濃度をそれぞれ 3 濃度を table1 に示した. これらの条件を直交計画法を用いて 9 のグループを作成し, それぞれの条件で PCR を行い, 電気泳動を行った. 結果が Fig.1 に示した.



Fig. 1 Orthogonal design of SSR - PCR
M; DNA marker DL 2000; Lane 1-9; Group 1-9

Fig.1 の結果から Group 1-9 を Degree 1 から 6 に当てはめ, その結果を table2 の右側のカラムに示した. K_i の結果から, 鋳型 DNA 濃度 30mg/l, TaqDNA 合成酵素濃度 1U, dNTP 濃度 150 $\mu mol/l$, プライマー濃度 0.25 $\mu mol/l$ が最適とされた.

この条件下で, PCR のアニリング温度とサイクル数を検討した結果が, Fig.2 である. 温度を 50, 53, 55°C およびサイクル数を 30 回と 35 回で行った.

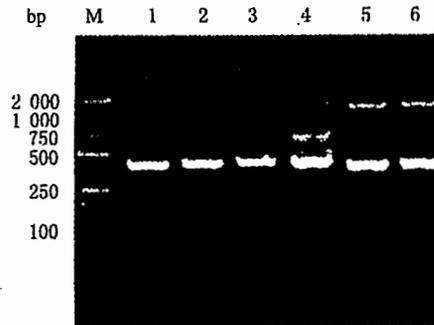


Fig. 2 The effect of annealing temperatures and cycles on SSR-PCR amplification

M, DNA marker DL 2 000; Lane 1; 50°C and 30 cycles; Lane 2; 50°C and 30 cycles; Lane 3; 53°C and 30 cycles; Lane 4; 53°C and 35 cycles; Lane 5; 55°C and 30 cycles; Lane 6; 55°C and 30 cycles

この結果から、アニリング温度 53°C、サイクル数は 35 回が最適条件であることが明らかとなった。

考察:

老年患者呼吸器系真菌感染の調査および臨床研究

深在性真菌症患者の多くは、原発の疾病を持っている。特に老年の患者では抵抗力が著しく低下しており、真菌感染が致命的となる場合も多い。*Candida albicans* は、口腔内に常在する菌でもあり、免疫能が低下すると血中に移行して全身感染に至る場合は多いので、本菌が 53.73% を占めたことは、理解できる。しかし、*Aspergillus* の感染率は高いと思われた。特に深在性には移行しにくい *A. nidulans*, *A. terreus* がそれぞれ 1 例有ったことは注目に値する。*A. fumigatus* と *A. flavus* は深在性に移行しやすいが、検出頻度は、高いように思われる。老年患者の治療に当たっては真菌症感染の機会が高いことを念頭に、治療に当たることが望まれる。

直交計画法による SSR-PCR の反応条件の最適化

PCR の反応条件の検討には、本来、条件全ての組み合わせによる検討が必要であるが、直交計画法による実験数の節約は重要である。本研究の条件組み合わせは、81 組が考えられるが、9 組の反応で最適反応条件を推定する事ができた。鋳型 DNA 濃度が高いと非特異的増幅をもたらしがちであるが、ここでは、試した中で最も高い 30ng が最適であった。dNTP 濃度、プライマー濃度は試した中で最も低い、それぞれ 150 μmol/l, 0.25 μmol/l であった。今後、様々な菌に対する PCR の条件検討の場合にこの方法は役立つと考えられる。

成果発表論文:

- 1) 楊 艶秋, 賀 丹, 許 建成, 張 雲峰, 張 波, 横山耕治, 王 麗: 老年患者呼吸系統真菌感染的検出及臨床研究. 中国老年学雑誌. 26 卷, p. 930-932, 2006.
- 2) YANG Yan-Qin, HE Dan, WANG Shuang, GUO Liang, ZHANG Yu, YOKOYAMA Koji, WANG LI. Optimization of SSR-PCR reaction system in fungus by orthogonal design. Journal of Jilin University (Medical Edition) Vol. 32, No. 6 Nov. 2006.

学会発表:

Wang L, Yang Y, He D, Guo L, Zhang Y, Zhang B, Yokoyama K: 真菌の SSR-PCR 条件の適正化に関する研究. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増刊 1 号), p58, 東京, 2006.

作成日: 2007 年 3 月 15 日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2007年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 小林圭子 

所属機関名： 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

所属部署： 分子病態生化学 職名： 助教授
〒 890-8544

所在地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1

電話： 099-275-5242 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

中国・揚子江南方地域におけるシトリン欠損症の患者発見とSLC25A13変異頻度検索

3. 成果の概要 (100字程度)

日本人症例で同定した15~16種のSLC25A13変異検索を行い、湖南省・黄疸症例77例中2例のヘテロ接合体、福建省・肝癌症例36例中1例のヘテロ接合体、広東省・代謝異常症例110例中11例のヘテロ接合体・17例の変異ホモ接合体(シトリン欠損症の患者)を見いだした。患者発見には、中国医療関係者の疾患周知・理解・認識が重要である。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 小林圭子 職名： 助教授

所属機関： 鹿児島大学 部署： 大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 魯耀邦 職名： 副教授

所属機関： 湖南中医薬大学 部署： 薬学院生物工程教研室

中国・揚子江南方地域におけるシトリン欠損症の患者発見と

SLC25A13 変異頻度検索

研究代表者	小林 圭子 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)
中国側共同研究代表者	魯 耀邦 (湖南中医薬大学薬学院)
共同研究者	牛飼 美晴、盛 建勝、飯島 幹雄 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)
	佐伯 武頼 (徳島文理大学健康科学研究所)
	李 孟賢、祝 益民、高 喜容 (湖南省児童医院)
	宋 元宗 (暨南大学第一医院)
	劉 麗 (広州市児童医院)
	林 玲、高 宏志 (福建医科大学第二医院)

要旨

シトリン欠損症は、常染色体劣性の遺伝性疾患であり、現在少なくとも2つの病態：肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD) と成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) が知られている。東アジアの保因者頻度は高く、特に中国・揚子江南方地域では43人に1人の割合で保因者が存在する。保因者頻度から計算すると東アジアに10万人以上の変異ホモ接合体の存在が推測されるが、これまでに発見された患者は日本以外では極めて少ない。本研究では、揚子江南方地域の湖南省、広東省、福建省の研究機関と共同研究を行い、シトリン欠損症の患者発見のために啓蒙活動、診断提供と技術指導を実施した。本研究結果と過去の診断例を合わせると、分子遺伝学的に診断した中国人症例は40例（中国、台湾、オーストラリア、マレーシア、米国在住）になる。これまで分子遺伝学的に診断した日本人症例は370例を超えるので、中国をはじめとする東アジアにおいて、シトリン欠損症の疾患概念の周知と診断システムの確立を図る必要がある。

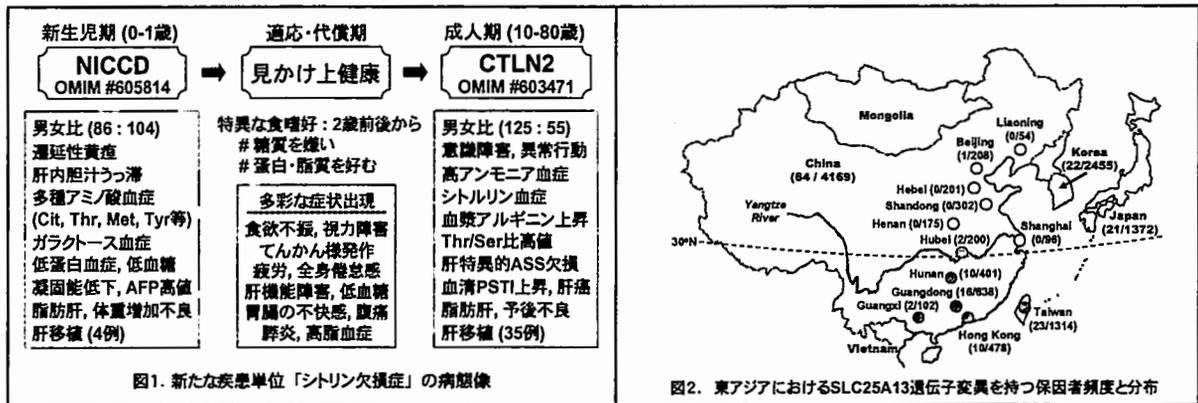
Key Words シトリン欠損症, SLC25A13, アスパラギン酸・グルタミン酸ミトコンドリア膜輸送体, 成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2), 肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (NICCD)

緒言

研究代表者の小林らは、長年原因不明で日本に多発する重篤な肝脳疾患、成人発症 II 型シトルリン血症 (adult-onset type II citrullinemia: CTLN2) の責任遺伝子 SLC25A13 を発見し、新規遺伝子産物をシトリン (citrin) と命名した¹⁾。さらに、CTLN2 の新生児期病態として、肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎 (neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: NICCD) の発見・命名^{2,6)}により、「シトリン欠損症」という新規疾患概念を提唱した (図1)^{1,5-7)}。日本において、これまで CTLN2 症例160余例と NICCD 症例200余例を分子遺伝学的に確定診断すると同時に、SLC25A13 変異13種を一般集団で検索し、保因者が高頻度 (1/65) に存在することを明らかにした^{5,8)}。

一方、日本人と同じ変異を持つ中国人 CTLN2 症例を分子遺伝学的に診断したこと^{9,10)}により、東アジアの一般集団で12種の変異頻度検索を行い、中国・揚子江南方地域において、より高頻度 (1/43) に保因者が存在することを見いだした (図2)^{11,12)}。中国南部では、保因者頻度から計算される両 allele に SLC25A13

変異を持つホモ接合体頻度は 1/7,400 となり、80,000 人を超える患者の存在が予想される。しかし、シトリン欠損症は多彩な症状・複雑な病態 (NICCD > 見かけ上健康 > CTLN2 あるいは他疾患) を呈し、分子遺伝学的手法でしか確定診断できないためか、日本以外では、これまでに発見された患者数は極めて少ない⁹⁻¹⁵⁾。本研究の目的は、特に中国南部を中心に、疾患の啓蒙活動と診断技術の提供を行い、日中共同研究により、シトリン欠損症の患者を発見することである。



対象と方法

- # 対象：湖南省・長沙では黄疸を呈する症例 77 例、広東省・広州ではガラクトース血症あるいはチロシン血症などの代謝性疾患が疑われた症例 110 例、福建省・泉州では肝癌症例 36 例を、シトリン欠損症診断の対象者とした。
- # 方法：乾燥濾紙血あるいは末梢血から抽出した DNA を鋳型にして、日本人症例で同定した比較的頻度の高い SLC25A13 変異 15~16 種：[I]~[V]¹⁾、[VI]・[VII]⁷⁾、[VIII]・[IX]⁵⁾、[X]・[XI]・[XIV]¹²⁾、[XX]¹⁶⁾、[XVI]・[XIX]・[XXII] (Tabata et al. 論文作成中) を、PCR/RFLP 法や SNaPshot/GeneScan 法を用いて検索した。既知変異が検出されない症例について、RNA を用いた RT-PCR/sequencing および genomic DNA-PCR/sequencing 法により変異同定後、遺伝子診断法を確立した。
- # 啓蒙活動と診断技術提供：中国語の総説発表、学会発表と論文投稿を行うとともに、中国の共同研究者グループに対して診断技術指導を実施した。

結果

- ① 変異同定：既知変異 [I]:851del4 を 1 つの allele に見いだした米国在住の中国人 NICCD 症例において、変異解析を行い、SLC25A13 遺伝子の exon-12 内に新規変異 [XXIV]: C1189T (Q397X) を同定した^{a,d)}。変異診断系確立後、両親の遺伝子検索を行い、[I] は母親由来、[XXIV] は父親由来である結果を得た。さらに、国内外のシトリン欠損症症例において、数種の新規変異を見だし、遺伝子診断法の確立ならびに頻度検索を行っている (Song et al. 未発表)。
- ② 患者診断：SLC25A13 変異 15~16 種を検索し、湖南省サンプル・黄疸症例 77 例では 2 例のヘテロ接合体 (1/38.5)、福建省サンプル・肝癌症例 36 例では 1 例のヘテロ接合体 (1/36) を見いだした。また一方、広東省サンプル・ガラクトース血症やチロシン血症など 110 例では、11 例のヘテロ接合体 (1/10: 未知変異を持つ患者を含む可能性大) と 17 例の変異ホモ接合体 (患者発見率: 1/6.5) を検出した^{b,c,f)}。
- ③ 啓蒙活動：第 10 回国際先天代謝異常学会 (幕張) におけるシトリン欠損症に関する発表は^{a-d)}、世界から集まった 1,000 名を超える参加者の中で注目を集めた。また一方、中国各地の医療関係者に対して、シトリン欠損症の疾患概念を周知するために、中国語による総説掲載^{e)}と論文投稿^{f)}を行った。

考察

本研究：日中医学協会助成事業ならびに JSPS-アジア・アフリカ学術基盤形成事業（平成 18～20 年度、小林圭子）の遂行により、中国を中心とした東アジアにおいて、「シトリン欠損症」に対する関心が高まり、広東省・広州では数多くの患者を発見することができ、大きな成果が得られた。日本における NICCD 症例の 40%は新生児マス・スクリーニング陽性を示し^{8,16-22)}、今回の広東省の解析もそれを支持する結果が得られており、中国においてガラクトース、チロシン、メチオニン、シトルリンなどの検査の導入は不可欠である。一方、CTLN2 患者では各 10%が肺炎、高脂血症、肝癌を合併^{6-8,15,23-28)}しており、さらに中国南部は肝癌患者多発地域であることが知られている。シトリン欠損症の可能性のある疾患・患者を検索したにも関わらず、湖南省の黄疸患者および福建省の肝癌患者におけるヘテロ接合体の割合は、一般集団の頻度と同じ、あるいは若干高い程度であった。これらは検索した患者数が少ないことに起因する可能性もある。少なくともそれぞれの疾患の中で、シトリン欠損症が大きな割合を占めるものではないと考えられるが、それら疾患形成にどの程度関与するかを検討するには、より多くの症例を検索すると同時に、アルコールが飲めない、甘いものが嫌いなどの因子を加えて絞り込みを行い、詳細に解析する必要があると考える。シトリン欠損症は日本や中国に限らず、世界中に患者が存在することが明らかになってきている^{8,29,30)}ので、疾患の啓蒙活動、診断法の開発³¹⁾に加えて、治療法の開発が今後の重要な課題となる。

参考文献：

1. Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, et al. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 22: 159-163 (1999)
2. Tazawa Y, Kobayashi K, Ohura T, et al. Infantile cholestatic jaundice associated with adult-onset type II citrullinemia. *J Pediatr* 138: 735-740 (2001)
3. Tomomasa T, Kobayashi K, Kaneko H, et al. Possible clinical and histologic manifestations of adult-onset type II citrullinemia in early infancy. *J Pediatr* 138: 741-743 (2001)
4. Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* 108: 87-90 (2001)
5. Yamaguchi N, Kobayashi K, Yasuda T, et al. Screening of SLC25A13 mutations in early and late onset patients with citrin deficiency and in the Japanese population: identification of two novel mutations and establishment of multiple DNA diagnosis methods for nine mutations. *Hum Mutat* 19: 122-130 (2002)
6. Saheki T, Kobayashi K. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). *J Hum Genet* 47: 333-341 (2002)
7. Yasuda T, Yamaguchi N, Kobayashi K, et al. Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* 107: 537-545 (2000)
8. Kobayashi K, Saheki T. Citrin deficiency. *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource*, developed at the University of Washington, Seattle [<http://www.genetests.org>] (2005/2006)
9. Hwu W-L, Kobayashi K, Hu Y-H, et al. A Chinese adult onset type II citrullinaemia patient with 851del4/1638ins23 mutations in the *SLC25A13* gene. *J Med Genet* 38: E23 (2001)
10. Yang YL, Tagami Y, Saheki T, et al. Adult-onset type II citrullinemia: a family analysis. *Chin J Med Genet* 20: 380 (2003)
11. Kobayashi K, Lu YB, Li MX, et al. Screening of nine SLC25A13 mutations: their frequency in patients with citrin deficiency and high carrier rates in Asian populations. *Mol Genet Metab* 80: 356-359 (2003)
12. Lu YB, Kobayashi K, Ushikai M, et al. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the *SLC25A13* gene of Japanese patients with citrin deficiency. *J Hum Genet* 50: 338-346 (2005)
13. Song YZ, Hao H, Ushikai M, et al. A difficult and complicated case study: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Chin J Contemp Pediatr* 8: 125-128 (2006)
14. Lee N-C, Chien Y-H, Kobayashi K, et al. Time course of acylcarnitine elevation in neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 29: 551-555 (2006)
15. Tsai CW, Yang CC, Chen HL, et al. Homozygous SLC25A13 mutation in a Taiwanese patient with adult-onset citrullinemia complicated with steatosis and hepatocellular carcinoma. *J Formos Med Assoc* 105: 852-856 (2006)
16. Takaya J, Kobayashi K, Ohashi A, et al. Variant clinical courses of 2 patients with neonatal intrahepatic cholestasis who have a novel mutation

- of *SLC25A13*. *Metabolism* 54: 1615-1619 (2005)
17. Naito E, Ito M, Matsuura S, et al. Type II citrullinaemia (citrin deficiency) in a neonate with hypergalactosaemia detected by mass screening. *J Inherit Metab Dis* 25: 71-76 (2002)
 18. Ohura T, Kobayashi K, Abukawa D, et al. A novel inborn error of metabolism detected by elevated methionine and/or galactose in newborn screening: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Eur J Pediatr* 162: 317-322 (2003)
 19. Nishimura Y, Tajima G, Dwi Bahagia A, et al. Differential diagnosis of neonatal mild hypergalactosaemia detected by mass screening: clinical significance of portal vein imaging. *J Inherit Metab Dis* 27: 11-18 (2004)
 20. Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, et al. Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res* 56: 608-614 (2004)
 21. Hachisu M, Oda Y, Goto M, et al. Citrin deficiency presenting with ketotic hypoglycaemia and hepatomegaly in childhood. *Eur J Pediatr* 164: 109-110 (2005)
 22. Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, et al. Clinical pictures of 75 patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* in press (2007)
 23. Kobayashi K, Iijima M, Yasuda T, et al. Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. *Calcium: The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (ed. Pochet R) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 565-587 (2000)
 24. Ikeda S, Kawa S, Takei Y, et al. Chronic pancreatitis associated with adult-onset type II citrullinemia: clinical and pathological findings. *Ann Intern Med* 141: W109-W110 (2004)
 25. Terada R, Yamamoto K, Kobayashi K, et al. Adult-onset type II citrullinemia associated with idiopathic hypertriglyceridemia as a preceding feature. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 1634-1635 (2006)
 26. Takagi H, Hagiwara S, Hashizume H, et al. Adult onset type II citrullinemia as a cause of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 44: 236-239 (2006)
 27. Hagiwara N, Sekijima Y, Takei Y, et al. Hepatocellular carcinoma in a case of adult-onset type II citrullinemia. *Intern Med* 42: 978-982 (2003)
 28. Soeda J, Yazaki M, Nakata T, et al. Primary liver carcinoma exhibiting dual hepatocellular-biliary epithelial differentiations associated with citrin deficiency: a case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* in press (2007)
 29. Ben-Shalom E, Kobayashi K, Shaag A, et al. Infantile citrullinemia caused by citrin deficiency with increased dibasic amino acids. *Mol Genet Metab* 77: 202-208 (2002)
 30. Dimmock DP, Kobayashi K, Iijima M, et al. Citrin deficiency: a novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. *Pediatrics* 119: 773-777 (2007)
 31. Tokuhara D, Iijima M, Tamamori A, et al. Novel diagnostic approach to citrin deficiency: analysis of citrin protein in lymphocytes. *Mol Genet Metab* 90: 30-36 (2007)

注：本研究は、「第10回国際先天代謝異常学会」(2006年9月12-16日、幕張)にて口頭発表^{a,b)}ならびにポスター発表^{c,d)}、「中華医学遺伝学雑誌」(2006年12月)に総説掲載^{e)}、「中華児科雑誌」(2006年11月)に論文投稿^{f)}

- (a) Kobayashi K, Iijima M, Ushikai M, Lu YB, Tabata A, Sheng J-S, Saheki T, Okano Y, Yang Y, Hsiao K-J, Lau Y-L, Tsui L-C, Hwu W-L, Lee DH. *SLC25A13* mutations in citrin deficiency and the frequency. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 26 (2006)
- (b) Liu L, Kobayashi K, Ushikai M, Saheki T, Li XZ, Mei HF, Cheng J. *SLC25A13* mutation analysis in Chinese hepatitis syndrome. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 26 (2006)
- (c) Song YZ, Wang ZN, Ushikai M, Saheki T, Kobayashi K. Citrin deficiency (NICCD) in South China: A report of two cases. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 157 (2006)
- (d) Sheng J-S, Ushikai M, Iijima M, Packman S, Weisiger K, Martin M, McCracken M, Saheki T, Kobayashi K. Identification of a novel mutation in a Taiwanese patient with citrin deficiency. *J Inherit Metab Dis* 29 (Suppl. 1): 163 (2006)
- (e) Yao-Bang Lu, Fei Peng, Meng-Xian Li, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki. Progresses and perspectives in the study on citrin deficiency. *Chin J Med Genet* 23: 655-658 (2006)
- (f) Yuan-Zong Song, Miharuru Ushikai, Jian-Sheng Sheng, Mikio Iijima, Keiko Kobayashi. *SLC25A13* gene mutation analysis in a pedigree of neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. *Chin J Pediatr* (submission)

作成日：2007年3月14日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 12日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 伊藤 亮 

所属機関名： 国立大学法人 旭川医科大学

所属部署： 医学部・寄生虫学講座 職名： 教授
〒078-8510

所在地： 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

電話： 0166-68-2420(ダイヤルイン) 内線：

1. 助成金額： 850,000 円

2. 研究テーマ

新疆ウイグル自治区におけるエキノコックス症その他人畜共通寄生虫病に関する分子・免疫疫学研究

3. 成果の概要 (100字程度)

青海省崑崙山脈と唐古拉山脈の間に位置する野生動物の保護地域、可可西里高原(揚子江源流域)でエキノコックス症の調査をフランス、日本、中国の国際共同調査として試み、野生動物における多包条虫感染を確認した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 伊藤 亮 職名： 教授

所属機関： 国立大学法人 旭川医科大学 部署： 医学部・寄生虫学講座

中国側研究者氏名： 馬木提 吾拉木 職名： 助教授

所属機関： 新疆医科大学 部署： 基礎医学院・病原生物学講座

新疆ウイグル自治区におけるエキノコックス症その他人畜共通寄生虫病に関する分子・免疫疫学研究

研究者氏名	伊藤 亮
所属機関と役職	旭川医科大学、教授
共同研究者名	Mamuti Wulamu 新疆医科大学助教授 Wang Hu 青海省地方病研究所所長 Qiu Jiamin 四川省寄生虫病研究所名誉職員

要旨

中国で蔓延しているエキノコックス症の流行現場のひとつは四川省、青海省にまたがるチベット高原東北部地域である。本研究調査ではこれまでに調査されることがない青海省崑崙山脈と唐古拉山脈の間に位置する野生動物の保護地域、可可西里高原(揚子江源流域)でエキノコックス症の調査を試みた。青海省地方病研究所、Dr. Wang Hu 所長からフランス、イギリス、日本それに中国の4か国合同調査の形で可可西里高原における調査を実施したいという話が届いた。これまで外国人を含めた調査は1度もされたことがない秘境であり、この調査は青海省地方病研究所が同地域でペストの調査を2006年に展開していることから、これらの調査基地を中心にエキノコックス症調査を試みるということが可能であるという提案であった。2006年6月に新疆ウイグル自治区に出張し、新疆医科大学学長と今後の共同研究展開についての意見交換を行ない、ウルムチ郊外での条虫症(テニア症)の流行について予備的調査を試みた。そのあと、新疆医科大学助教授 Mamuti W(通訳兼)、Wang Hu 所長と研究所職員、フランスの研究チームとの合同調査として2006年7月に可可西里高原におけるエキノコックス症調査を実施した。野生動物王国だけあり、患者の有無は今回の調査からは確認されなかったが、野生動物間でのエキノコックス条虫(*Echinococcus multilocularis* 多包条虫)は少なからず発見された。特に興味深かったことはこれまでこの地域にはチベットギツネとアカギツネの2種類が分布していることを確認していたにもかかわらず、もう一種、コサックギツネも分布していることが判明した。その結果、これら3種類のキツネの糞便の鑑別を可能にする分子検査法の開発が必要になった。これまで調査してきた四川省、青海省の省境周辺地域ならびにチベット東部地域以外で多包条虫が発見されたことから、中国国内での多包条虫の分布がチベット高原から崑崙山脈までかなり広い範囲であることが判明してきた。これまでの調査成績に基づけば、新種エキノコックス(*Echinococcus shiquicus*)を含む3種のエキノコックスが同所的に分布していることが判明しているチベット高原東北部(四川省、青海省)に接しているチベット東北部の調査を最優先させるべきであると考えられる。この地域で流行が確認される場合に、唐古拉山脈の南部、さらに北部の可可西里高原まで調査地域を拡大させるべきであると結論された。

Key Words エキノコックス症、テニア症、野生動物、新疆ウイグル自治区、青海省、崑崙山脈、唐古拉山脈、可可西里高原、揚子江源流域

緒言

中国内陸部、主に四川省、青海省、甘肅省、新疆ウイグル自治区においてエキノコックス症(多包虫症)が流行している

ことは1990年に始めた国際共同研究成果としてかなり明らかになってきている(Craig et al. 2006)。イギリス、フランス、ニュージーランド、アメリカ、日本がそれぞれ独自に展開してきた国際共同研究であり、すべての共同研究に参加を求められたのが旭川医科大学であった。それは旭川医科大学でエキノコックス症に関する血清診断法の研究で国際的に評価されていたことによる。それぞれの国際共同研究が別個に展開されるよりもまとまって実施する方が効率的であると判断し、2000年7月に四川省成都で旭川医科大学、伊藤亮の提案で国際ワークショップが開催された。中国中央政府からも公衆衛生担当の部長、局長が参加した(Ito et al. 2003)。

本研究では新疆ウイグル自治区におけるテニア症の流行についての予備調査を行い、それに引き続き、青海省崑崙山脈からチベット自治区省境、唐古拉山脈の間に広がる可可西里高原(揚子江源流域)におけるエキノコックス症調査を行った。中国の中でも一、二を争う秘境でのエキノコックス症調査が2006年にだけ可能になるという情報により、本研究の主な対象をこの地域での調査にしぼった。この秘境の野生動物にエキノコックスが感染しているのかについての資料が手に入れば非常に貴重であるという角度からの調査である。我々の調査に先立ち四川省寄生虫病研究所のQiu JM博士達の調査隊が四川省からチベット北東部を通って、唐古拉山脈を越えて、可可西里高原に5月に入境し、動物ならびに住民の調査を展開した。本研究ではこの四川省寄生虫病研究所が調査した地域とは異なる地域を選定した。四川省寄生虫病研究所、青海省地方病研究所の合同調査から得られた患者血清、患者の肝病巣、寄生虫サンプルについての解析も目的に含まれた。

対象と方法:

野外調査:新疆ウイグル自治区ではテニア症(無鉤条虫症)が稀でなく、牧畜(ウシ)地域での住民の生活環境調査を予備的に試みた。崑崙山脈とタングラ山脈に囲まれた可可西里高原(揚子江源流域)における地域住民、野生動物におけるエキノコックス感染の有無についての調査:住民については問診、画像診断、血清検査、動物調査についてはトラップによって捕獲されるネズミ類を中心に肝臓病変の有無の確認、交通事故、自然死などで見つかるキツネの小腸を解剖し、エキノコックス条虫の有無を確認する、この3通りの検査法を採用した。

実験室内での解析:基本的には中国人研究者が血清、遺伝子、すべての解析を旭川医大研究グループの技術指導の下で展開する形を採用した。

結果:

2006年6月～7月の調査結果ならびに実験室内での解析結果

- 1) 新疆ウイグル自治区:無鉤条虫感染住民が1人が発見されたが、感染ウシ等の確認はできなかった。
- 2) 青海省、可可西里高原住民の画像診断から、エキノコックス症を疑える住民は発見されなかった。
- 3) 約500匹のネズミ、ナキウサギを捕獲し、肝臓病変の有無を調べたが、エキノコックス感染を疑わせる肝病変を持つ個体は皆無であった。
- 4) キツネは2頭が捕獲されたが、1頭はアカギツネ、もう1頭はコサックギツネとフランスの研究者により形態学的に同定された。アカギツネからエキノコックス条虫が多数発見された。旭川医科大学でエキノコックス(多包条虫)遺伝子が確認された。
- 5) 青海省でエキノコックス症の流行が深刻な地域の住民血清、四川省のQiu JM博士のチームが入手したサンプルを用い、エキノコックス感染に特異的な抗体検査を要請され、四川省寄生虫病研究所の研究者を招聘し、解析が進められているが、未完成である。2007年に再度研究者の招聘を含めた計画を実施する必要がある。

考察:

中国におけるエキノコックス症を引き起こす寄生虫としてこれまで多包条虫(*E. multilocularis*)と単包条虫(*Echinococcus granulosus*)が報告されていたが、我々の2005年までの共同研究から、さらにもう1種類 *E. shiquicus*(新種)が同所的に分布していることが判明した。これまで、3種が同所的に分布している地域は四川省北西地域から青海省南部地域の一帯である。今回の青海省崑崙山脈から唐古拉山脈(チベット自治区との省境)の間の、いわゆる可可西里高原(揚子江源流域)での調査からは新種 *E. shiquicus* はまだ見つかっていない。この地域に住む住民の密度は極端に低いことから、住民調査には困難が伴うと予測される。それゆえ、野生動物からエキノコックスが見つかるかどうかの調査を優先的に、継続的に展開する必要がある。これまでの調査成績を総合的に分析すれば、むしろ、チベット北東部地域でのエキノコックス症患者証明と動物におけるエキノコックス感染の証明の方が重要と考えられる。この地域でエキノコックス症の流行が確認される場合に、そこから北上して唐古拉山脈の南側、それから唐古拉山脈の北側の可可西里高原に調査を展開する四川省方式の方が合理的である。四川省の Qiu JM 博士のチームが可可西里高原で入手したサンプルの解析ならびにこれまで許可されていないチベット自治区北東部地域の調査が重要であると結論された。

参考文献

1. Yang YR, Craig PS, Ito A, Vuitton DA, Giraudoux P, Sun T, Williams GM, Huang Z, Li Z, Wang Y, Teng J, Li Y, Huang L, Wen H, Jones MK, McManus DP. A correlative studies of ultrasound with serology in an area in China co-endemic for human alveolar and cystic echinococcosis. *Tropical Medicine and International Health* 2007 (in press).
2. Li T, Craig PS, Ito A, Chen X, Qiu D, Qiu J, Sato MO, Wandra T, Bradshaw H, Li L, Yang Y, Wang Q. Taeniasis/cysticercosis in a Tibetan population in Sichuan Province, China. *Acta Tropica* 2006;100:223-231.
3. Bart JM, Abdukader M, Zhang YL, Lin RY, Wang YH, Nakao M, Ito A, Craig PS, Piarroux R, Vuitton DA, Wen H. 2006. Genotyping of human cystic echinococcosis in Xinjiang, PR China. *Parasitology* 133, 571-579.
4. Xiao N, Nakao M, Qiu JM, Budke CM, Giraudoux P, Craig PS, Ito A. (2006) Dual infection of animals with different *Echinococcus* species in the Qinghai-Tibet plateau region of China. *Am J Trop Med Hyg* 75, 292-294.
5. Yang YR, Sun T, Li ZZ, Zhang JZ, Teng J, Liu XZ, Liu RQ, Zhao R, Jones MK, Wang YH, Wen H, Feng XH, Zhao Q, Zhao Y, Shi DZ, Bartholomot B, Vuitton DA, Playdell D, Giraudoux P, Ito A, Danson MF, Boufana B, Craig PS, Williams GM, McManus DP. (2006). Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui autonomous region, PR China. *Bulletin of WHO* 84, 714-721.
6. Yang YR, Ellis M, Sun T, Li ZZ, Liu XZ, Vuitton DA, Bartholomot B, Giraudoux P, Craig PS, Boufana B, Wang YH, Feng XH, Wen H, Ito A, McManus DP (2006). Unique family clustering of human echinococcosis cases in a chinese community. *Am J Trop Med Hyg* 74, 487-494.
7. Yang YR, Liu XZ, Vuitton DA, Bartholomot B, Wang YH, Ito A, Craig PS, McManus DP (2006). Simultaneous alveolar and cystic echinococcosis of the liver. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 597-600
8. Craig PS and Echinococcosis working group in China (2006). Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. *Parasitology International* 55: s221-s225.
9. Xiao N, Qiu JM, Nakao M, Li TY, Yang W, Chen XW, Schantz PM, Craig PS, Ito A (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: its discovery and epidemiological implication. *Parasitology International* 55: s233-s236.
10. Ito A, Urbani C, Qiu JM, Vuitton DA, Qiu DC, Heath DD, Craig PS, Feng Z, Schantz PM (2003) Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China. *Acta Tropica* 86, 3-17.

作成日:2007年3月12日

財団法人日中医学協会

2006 年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2007 年 03 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 横山 和仁 

所属機関名： 三重大学

所属部署： 大学院医学系研究科 職名： 教授
〒514-8507

所在地： 三重県津市江戸橋 2-174

電話： 059-231-5012 (直通)

1. 助成金額： 850,000 円

2. 研究テーマ

開発途上国における環境汚染の発生・生殖影響に関する研究

3. 成果の概要 (100 字程度)

開発途上国である中国・上海市の妊婦と新生児を対象として、分娩に関するデータ収集で鉛などの微量金属の血中濃度測定を行った。現在、収集された 116 例の基本データを単純集計し、ICP-MS の測定結果をまとめている。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 横山 和仁 職名： 教授

所属機関： 三重大学 部署： 大学院医学系研究科

中国側研究者氏名： 田 英 職名： 教授

所属機関： 上海交通大学 部署： 医学院・予防医学教室

開発途上国における環境汚染の発生・生殖影響に関する研究

研究者氏名 横山 和仁

日本研究機関 三重大学大学院医学系研究科

研究者氏名 田 英

中国所属機関 上海交通大学医学院予防医学教室

その他の共同研究者 北村文彦、木田博隆、許蕾

要 旨

近年、内分泌かく乱物質をはじめとする各種環境化学物質の低濃度曝露によるヒトへの健康影響、とりわけ次世代に継代されうる生殖影響、あるいは胎児への急性・慢性毒性影響が世界規模で危惧され、その実態解明が急がれている。本研究は鉛などの微量金属の非職業低濃度曝露を有する女性の妊娠、出産に至るまでの生殖機能影響、ならびにこれらの女性由来の胎児・新生児に出現する先天異常障害の量-影響（反応）関係を、中国上海市の妊婦と新生児を対象として検討した。

Key Word

微量金属、生殖影響、低体重児

結 言

微量金属はヒトの物質代謝を維持するのに不可欠であるが、これらの物質の体内蓄積は中毒になる原因でもある。環境汚染の職業性曝露がヒトへの健康影響は従来から知られていたが¹⁻³⁾、近年、内分泌かく乱物質をはじめとする各種環境化学物質の低濃度曝露によるヒトへの健康影響、とりわけ次世代に継代されうる生殖影響、あるいは胎児への急性・慢性毒性影響が世界規模で危惧され、その実態解明は急務である。特に、国際的にみると、化学物質などの微量曝露によって生じる生殖・発生影響のヒトにおける解明はまだ不十分である。

近年の先行研究では、中村ら⁴⁾や佐藤ら⁵⁾は、ラットを用いて、妊娠中カドミウム(Cd)の低濃度曝露による母子間移行及び胎児毒性に関して実験し、低濃度のCd 曝露が母体骨代謝と胎児毒性に影響を及ぼしていると報告した。また、仲井ら⁶⁾はマウスを用いて低濃度メチル水銀長期曝露による神経行動的影響を解析し、有意に影響があると確認された。一方、ヒトにおける環境化学物質の低濃度曝露について、Mohsenら⁷⁻⁹⁾は鉛などの重金属と生殖・胎児毒性影響との因果関係を分析し、鉛(Pb)、アンチモン(Sb)、マンガン(Mn)の環境曝露が妊娠高血圧、子癇前症のリスク要因であると報告したが、実際環境化学物質の微量曝露と胎児毒性影響との因果関係に関する研究は多くない。

一方、出産期医療の発展につれ、正常体重児の死亡率は大きく減少したが、早産や低体重児の死亡率は相当高く、低体重は出産期死亡の主な原因となっている¹⁰⁾。また、妊娠中に妊婦体内の微量元素の濃度が新生児の体重や出産後児の発育に影響を及ぼしているという報告がある¹¹⁻¹⁵⁾。したがって、環境化学物質の微量曝露と生殖・胎児毒性影響との因果関係を明らかにすることは、人類の存続に直接関わる生殖機能を正常に維持し、次世代を担う胎児の健全な出生をサポートするための予防医学的あるいは臨床医学的方策を決定する上で極めて重要であると思われる。

そこで、本研究は研究交流の持続的進展を図るとともに、開発途上国である中国・上海における環境因子

の健康影響の研究の発展を目指して、鉛などの金属の非職業低濃度曝露を有する女性の妊娠、出産に至るまでの生殖機能影響、ならびにこれらの女性由来の胎児・新生児に出現する先天異常障害、特に低体重児に焦点を当たって、量-影響（反応）関係を明らかにすることを目的とする。

対象と方法

中国の工業化都市—上海を対象地域とした。上海市は1350万人を超える大都会で6340平方キロメートル以上の面積を有し、軽工業化による環境汚染が著しい地域である。また、農村近郊の人口も少なくなく、総人口の約30%を占めている。調査とした病院は、サンプルを一般化しやすいため、市中心にある上海交通大学医学院附属瑞金病院と市近郊にある上海市第七人民病院の産婦人科を選んだ。

研究期間：平成18年4月～3月

研究対象者：以下の条件を満たし、研究期間に分娩した（自然分娩）妊婦、その配偶者及び胎児

- A. 両親とも遺伝性疾患、先天性疾患がないこと；
- B. 多胎でないこと；
- C. 母親は肥満、妊娠中毒、妊娠高血圧がないこと；
- D. 孕齢は ≥ 37 週、体重は2500g以下であること

研究方法：対象とする妊婦・配偶者に研究目的と方法を十分説明し予め同意を得た上で（informed consent）以下を行った。

1. データ収集：以下を収集した。①母親（妊婦）の静脈血および臍帯血（出産時）、尿。②母親の年齢、体重、身長、血圧、教育歴、収入、分娩形態、職歴、喫煙・飲酒、既往歴（周産期異常を含む）、妊娠・出産歴、飲料水供給源（水道、井戸など）、牛乳消費量等。③新生児の出産週齢、身長、体重、頭囲、胸囲、Apgar score、先天異常（体表奇形ほか）等。④父親（配偶者）の年齢、体重、身長、血圧、教育歴、収入、職歴、喫煙・飲酒、既往歴、飲料水供給源（水道、井戸など）、牛乳消費量等。②、③、④は病院の診療記録および本人への面接聞き取り調査により収集した。
2. 解析方法：母親の静脈血及び臍帯血は病院で採取し、上海交通大学医学院で一般生化学分析を行った。残りは冷凍保存（ -20°C ）して、予定数の試料が集まったら上海交通大学医学院附属児童医学研究センターでICP-MSを用いて、鉛(Pb)、アンチモン(Sb)、マンガン(Mn)、カドミウム(Cd)、コバルト(Co)、亜鉛(Zn)、水銀(Hg)、砒素(As)などの微量金属と農薬（および代謝物）の濃度を測定した。

結果

現在まで収集された116例のデータの単純集計は以下の通りに報告する。今後ICP-MSの結果をまとめてゆく予定である。

1. 妊婦及び配偶者の基本データ

項目	最小値	最大値	平均値	標準偏差
妊婦の年齢	19	40	27.96	4.257
妊婦の妊娠前体重	41.0	73	53.435	5.7984
妊婦の出産前体重	50.0	94.0	68.967	9.1139
妊婦の身長	136.0	173.0	161.495	4.9509
父親の年齢	20	48	30.39	5.149
父親の体重	51	135	73.16	11.991
父親の身長	161	189	174.46	4.731

2. 妊婦及び配偶者の生活習慣に関するデータ

項目		妊婦	配偶者
喫煙歴	あり	114 (98.3%)	60 (51.7%)
	なし	1 (0.9%)	51 (44.0%)
受動喫煙歴	あり	67 (57.8%)	55 (47.8%)
	なし	48 (41.4%)	60 (52.2%)
飲酒歴	あり	113 (97.4%)	31 (26.7%)
	なし	2 (1.7%)	80 (69.0%)
飲用水供給源	水道水	52 (44.8%)	61 (52.6%)
	井戸水	1 (0.9%)	0
	浄水器の水	51 (44.0%)	49 (42.2%)
	ペットボトル浄水	9 (7.8%)	2 (1.7%)
牛乳の飲用	あり	99 (85.3%)	66 (56.9%)
	なし	11 (9.6%)	44 (37.9%)
医療保険の有無	あり	66 (56.9%)	
	なし	49 (42.2%)	

3. 妊婦の妊娠・分娩史

項目	あり	なし
月経異常	20 (17.2%)	92 (79.3%)
流産史	39 (33.6%)	76 (65.5%)
妊娠期定期検査	99 (85.3%)	7 (6.0%)
妊娠期の服薬	49 (42.2%)	61 (52.6%)
妊娠期放射線との接触	6 (5.2%)	108 (93.1%)
妊娠期農薬との接触	2 (1.7%)	113 (97.4%)
妊娠中に家庭内の農薬備蓄	1 (0.9%)	114 (98.3%)

4. 新生児の基本データ：新生児の中、男性 57 名、女性 59 名であり、全て先天性異常なし。

項目	最小値	最大値	平均値	標準偏差
新生児の週齢	32	41	38.44	1.343
新生児の体重	1200g	4840g	3261.68g	544.745g
新生児の身長	41cm	52cm	48.97cm	2.233cm
新生児の頭囲	32cm	37.5cm	34.659cm	1.2852cm
新生児の胸囲	30cm	38cm	33.306cm	1.815cm
新生児出産時の Apgar 評価	9	10	9.99	.105

5. 住まい環境

項目	あり	なし
最近 3 年内の内装	49 (42.2%)	63 (54.3%)
部屋内の匂い	9 (7.8%)	106 (91.7%)
住宅周辺の工場	9 (7.8%)	106 (91.7%)

住宅周辺の主な交通線	47 (39.5%)	68 (58.6%)
冬に暖房の使用	81 (71.9%)	33 (28.4%)
部屋内殺虫剤の使用	50 (43.1%)	64 (55.2%)

文献

1. 篠原厚子：内分泌・生殖機能と微量元素，治療 88(7)，1970-1974，2006
2. 西条旨子他：カドミウムの生殖毒性・次世代影響研究の現状と今後の課題，金沢医科大学雑誌 30(4)，475-478，2005
3. 児玉浩子：新生児・小児の微量元素の栄養状態の評価とその臨床，治療 88(7)，1896-1900，2006
4. 中村康宏他：カドミウムの母仔間移行とメタロチオネインの関与，日本衛生雑誌 59(2)：155，2004
5. 佐藤雅彦他：カドミウム妊娠期曝露における胎仔へのカドミウムの蓄積に及ぼすメタロチオネインの関与，日本衛生雑誌 59(2)：155，2004
6. 仲井邦彦他：低濃度メチル水銀による長期曝露の影響，日本衛生雑誌 58(1)：156，2003
7. Vigh, M., Yokoyama, K., Ramezanzadeh, F., Dahaghin, M., et al., 2006. Lead and other trace metals in preeclampsia: A case-control study in Tehran, Iran. Environmental Research 100, 268-275
8. Vigh, M., Yokoyama, K., et al., 2004. Relationship between increased Blood Lead and Pregnancy Hypertension in Women without Occupational Lead Exposure in Tehran, Iran. Archives of Environmental Health 59(2), 70-74
9. Vigh, M., Ramezanzadeh, F., Yokoyama, K., et al., Trace Metal Concentrations and Newborn Intrauterine Growth Restriction. (投稿中)
10. 林秀珍他：新生児低体重影響要因及び死因に関する研究，河南予防医学雑誌 12(1)，2001
11. 岡知子他：重金属ならびに内分泌攪乱化学物質の周産期曝露が産後の発達に及ぼす影響に関するコホート研究：新生児行動評価とその解析例，日本衛生雑誌 58(1)：156，2003
12. 羅紅權：妊婦及び新生児体内微量元素濃度と新生児発達との関係，四川省衛生管理幹部学院学報 22(4)，2003
13. 李芳他：妊婦血清及び胎児臍帯血の微量元素の濃度と新生児体重との関係，陝西医学雑誌 34(8)，2005
14. Arnaud, C., Pascal, B., Fred, P., 2005. Association between maternal smoking and low birth weight in Switzerland: the EDEN study. SWISS MED. WKLY 135, 525-530
15. Rose, D., Linda, D., David, S., Marc, S. D., 2006. The association between low level exposures to ambient air pollution and term low birth weight: a retrospective cohort study. Environmental Health 5(3)

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 岡野 善行 

所属機関名： 大阪市立大学大学院医学研究科

所属部署： 発達小児医学 職名： 講師
〒 545-8585

所在地： 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

電話： 06-6645-3816 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

東アジアでのフェニルケトン尿症の分子遺伝学的解析

3. 成果の概要 (100字程度)

我々の開発したフェニルケトン尿症(PKU)の遺伝子診断システムは61種類の遺伝子変異で345/358の遺伝子診断を可能とする優れた方法であった。フェニルアラニン呼気テストはPKUの各病型を明確に区別でき、テトラヒドロビオプテリンの反応性の診断に有効であった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 岡野 善行 職名： 講師

所属機関： 大阪市立大学大学院医学研究科 部署： 発達小児医学

中国側研究者氏名： 宋 昉 職名： 助教授

所属機関： 首都児科研究所 部署： 医学遺伝学教室

東アジアでのフェニルケトン尿症の分子遺伝学的解析

研究者氏名 岡野 善行

日本研究機関 大阪市立大学大学院医学研究科

研究者氏名 宋 昉

中国所属機関 首都児科研究所

要 旨

フェニルケトン尿症(PKU)は新生児マススクリーニングにより世界的な規模で化学診断、遺伝子診断、治療がなされている。我々の PKU 遺伝子診断システムは 1) GC clamp プライマーを用いた WAVE 核酸フラグメント解析法による異常エクソンの検出。2) 当該エクソンのダイレクトシーケンスによる遺伝子変異の同定。3) multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法による欠失変異の同定を行っている。今回、日本在住フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)欠損症患者 179 名の分析結果では、シーケンスにて遺伝子変異を 343/358 対立遺伝子に、MLPA 法にてエクソン 5&6 の欠失変異を 2/15 対立遺伝子に同定した。61 種類の遺伝子変異(15 種の新規変異)で遺伝子診断率は 96%であった。中国在住患者では 349/370 対立遺伝子(94.3%)で遺伝子変異を同定した。日中間で主要な遺伝子変異は共通しているがその頻度は異なっていた。また、少数個別的な遺伝子変異は異なっていた。¹³C-Phe 経口投与によるフェニルアラニン呼気テストでは *in vivo* PAH 活性 (¹³CO₂ の累積回収率、CRR%) は古典型と軽症型 PKU 患者、ヘテロ保因者、そして正常コントロールの各群で有意に異なっていた。軽症型 PKU ではテトラヒドロビオプテリン(BH₄)は残存 *in vivo* PAH 活性に比例して PAH を活性化した。

Key Words フェニルケトン尿症、フェニルアラニン水酸化酵素、ビオプテリン、遺伝子解析、呼気テスト

緒 言：

フェニルケトン尿症(PKU)は肝臓のフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の欠損によって発症する常染色体劣性遺伝疾患である。新生児マススクリーニングによる早期発見と早期治療の結果、PKU での精神運動発達遅滞等の症状は予防され、良好な経過をとっている。PAH 活性は主に肝臓で発現し、末梢血や繊維芽細胞では認められないことから、PKU の診断は PAH の測定ではなく、食事などの環境的要素の影響を受ける血中フェニルアラニン値でなされている。PKU は無治療時の血中フェニルアラニン値とフェニルアラニン摂取許容量から軽症高フェニルアラニン血症(HPA)から軽症型 PKU、古典型 PKU と種々の重症度が知られており、遺伝的な多様性が明らかにされている。酵素診断が通常行われていない PKU では患者の重症度を推定することは非常に重要である。遺伝子診断の目的の一つは臨床重症度の推定である。今回、我々は新しい PKU 遺伝子診断システムを開発し、日本在住患者 179 名について分析した。すなわち、1) GC clamp プライマーを用いた WAVE 核酸フラグメント解析法(DHPLC)による異常エクソンの検出。2) 当該エクソンのダイレクトシーケンス(DS)による遺伝子変異の同定。3) multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法による欠失変異の同定を行っている。フェニルアラニン呼気テストで *in vivo* PAH 活性を測定し、PKU の臨床表現型と遺伝子型の関係、テトラヒドロビオプテリン (BH₄) の反応性について検討した。中国在住患者 185 名について宋昉準教授が分析した結果もあわせて報告する。

対象と方法：

1) PKU の遺伝子解析

血中フェニルアラニン値(治療前)が5mg/dl以上の日本在住 PAH 欠損症患者 179 名/358 対立遺伝子について分析した。DHPLC 法では 40bp の GC-clamp プライマーを片側に用いて、13 エクソンを PTC-200 Thermal-cycler で PCR 増幅合成した。95°C 5 分で denature した後、45 分間で 25°C へクーリングした。DHPLC 分析には WAVE system (Transgenomics, UK)で行った。ヘテロデュプレックスを示したエクソンを PCR 増幅合成した後、GFX purification kit (Amersham)で抽出し、dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて ABI PRISM 310 genetic analyzer で分析した。遺伝子変異を同定できなかったサンプルは multiplex ligation- dependent probe amplification (MLPA, MRC Holland)法にて分析した。DNA 100ng を 98°C で 5 分間 denature した後、SALSA probe mix と MLPA buffer を加え 60°C 16 時間でハイブリダイゼーションした。54°C 15 分で ligation した後、6-FAM で標識されたプライマーを片側に用いて PCR 増幅合成した。TAMRA でラベルした内部サイズ標準(TAMRA-500, ABI)を使用して ABI-377 gel sequencer で分析した。中国在住 PAH 欠損症患者 185 名/370 対立遺伝子について single-strand conformation polymorphism で遺伝子変異のあるエクソンをスクリーニングした後、シーケンス解析した。

で遺伝子変異スクリーニングと

2) フェニルアラニン呼気テスト

PAH 欠損症 20 例 (男 11 人、1-23 歳)、6-ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素 (PTPS) 欠損症 2 例、ヘテロ保因者 4 例、正常コントロール 4 例について分析した。PKU 患者の内訳は、古典型 PKU (無治療時の血中フェニルアラニン値 >1.2mM) が 13 例、軽症型 PKU (0.6-1.2mM) が 6 例、軽症型 HPA (<0.6mM) が 1 例であった。¹³C-フェニルアラニン (¹³C-Phe、10mg/kg、最大量 200mg) を内服後、0、10、20、30、45、60、90、120 分に呼気を採取し、質量分析計 (Breath MAT Plus; Finnigan MAT, Germany)にて ¹³CO₂、¹²CO₂ を測定した。BH₄ (10mg/kg/日、最大量 200mg/日) を呼気テスト前 3 日間連日服用し BH₄ 反応性をチェックした。呼気テストでは、1) 呼気中の ¹²CO₂ に対する ¹³CO₂ の割合を Δ¹³C (‰) として、2) 投与された ¹³C-Phe のうち 120 分間の呼気中に ¹²CO₂ として排出された量を累積回収率 (CRR, %) を in vivo PAH 活性の指標とした。

結果:

1) PKU の遺伝子解析

PCR プライマーに GC-clamp プライマーを使用した DHPLC の結果の例を図 1 に示した。エクソン 12 の R413P 変異では、通常プライマーを使用した場合メインピークの左に 1 本の peak が確認できるだけであったが、GC-clamp プライマーではヘテロデュプレックス由来とホモデュプレックス由来の各 2 本のピークが確認でき、ピーク判定が明確になった。他のエクソンにおいても GC-clamp プライマーを使用することで遺伝子変異の存在を容易に検出できるようになった。次に MLPA 法でエクソン 5&6 欠失変異を検出した結果を図 2 に示した。コントロールサンプルと比較して欠失変異ではエクソン 5 と 6 に対応するピークが明らかに低下していた。そして、その面積比を比較するとコントロールの 0.4~0.6 であった。

日本在住 PAH 欠損症患者 179 名の分析結果では、改良 DHPLC 法とシーケンスにて遺伝子変異を 343/358 対立遺伝子に、MLPA 法にてエクソン 5&6 の欠失変異を 2/15 対立遺伝子に同定した。61 種類の遺伝子変異(15 種の新規変異)で遺伝子診断率は 96%であった。中国在住患者の 185 名の分析では 70 種類の遺伝子変異(15 種の

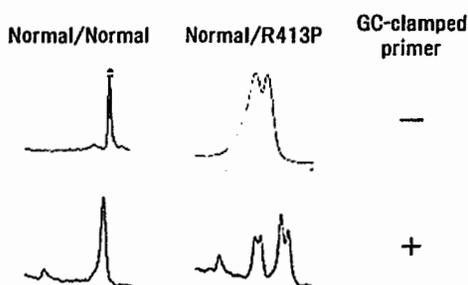


図1 DHPLCにおけるGC-clamped primerの影響

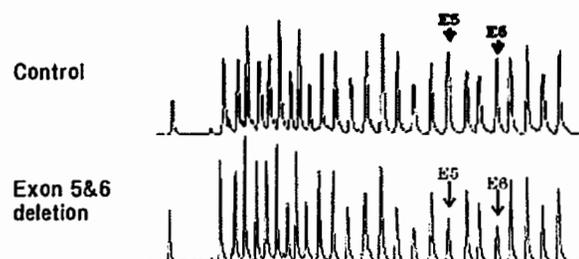


図2 MLPA法におけるエクソン5&6欠失変異の検出

新規変異)で遺伝子診断率は 349/370 対立遺伝子 (94.3%) であった。主要な遺伝子変異は R243Q、EX6-96A>G、R111X、Y356X、R413P でそれぞれの頻度は 22.2、11.1、8.7、6.5、6.5% であった。

2) フェニルアラニン呼気テスト

経口投与された ^{13}C -Phe が生体肝で代謝され呼気中に $^{13}\text{CO}_2$ として排出される。正常コントロールとヘテロ保因者では ^{13}C -Phe 投与後 20-30 分に $\Delta^{13}\text{C}$ のピーク値を示し、42.3% (28.7- 53.4%) と 27.2% (21.1-32.5%) であった。一方、古典型および軽症型 PKU では $\Delta^{13}\text{C}$ 値は低く、ピークも示さなかった。BH₄ 負荷後、軽症型 HPA の呼気中 $\Delta^{13}\text{C}$ 値は著明に増加し、20-30 分にピーク値 24.5% を示した。軽症型 PKU も同様に $\Delta^{13}\text{C}$ 値は増加しピーク値 8.87% (3.8-21.6%) を示した (図 3)

古典型 PKU、軽症型 PKU、軽症型 HPA、ヘテロ保因者、正常コントロールの各群で CRR は有意に異なっていた (図 4)。BH₄ 負荷により軽症型 PKU (4 例) と HPA (1 例) で CRR は 2.6 倍上昇したが、古典的 PKU 2 例ではその上昇を認めなかった。BH₄ 投与で血中フェニルアラニン値が 2mg/dl 以下にコントロールされている PTPS 欠損症患者 2 例の CRR は 5.88% と 19.0% であった。

軽症型 PKU 患者の遺伝子型は、軽症型変異 (L52S、R241C、R408Q) と重症型変異の複合ヘテロ接合体で、軽症型 HPA は R241C のホモ接合体であった。

考 察:

これまで PKU では世界中で 450 種類以上の遺伝子変異が同定されている (<http://www.pahdb.mcgill.ca>)。日本と中国での遺伝子解析では、それぞれ 61 種類と 70 種類の遺伝子変異が同定されている。頻度の多い主要遺伝子変異 (R111X、IVS4nt-1、EX6-96A>G、R241C、R243Q、Y356X、R413P) は両国に共通して認められることが多く、日本と中国の PKU 遺伝子のそれぞれ 67% と 63% を占めている。日本人と中国人では PKU 遺伝子種類と頻度は近似しているが、欧米白人のものとは異なっている。これらのことから PKU 遺伝子変異の大部分の発生起源は古く、白人種と別れて以降、両人種に分離する前であると推測される。今回同定された遺伝子変異では R241C、P407S、A373T、A132V、L52S、R408Q の各変異は PAH 活性が残存していると推測され、その遺伝子変異を有する患者は mild PKU もしくは mild HPA 患者であった。

フェニルアラニン呼吸テストでは経口投与された ^{13}C -Phe は小腸から吸収され、門脈を経過して肝細胞に輸送される。肝細胞内の ^{13}C -Phe は PAH により代謝され、チロシン、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸を経て、

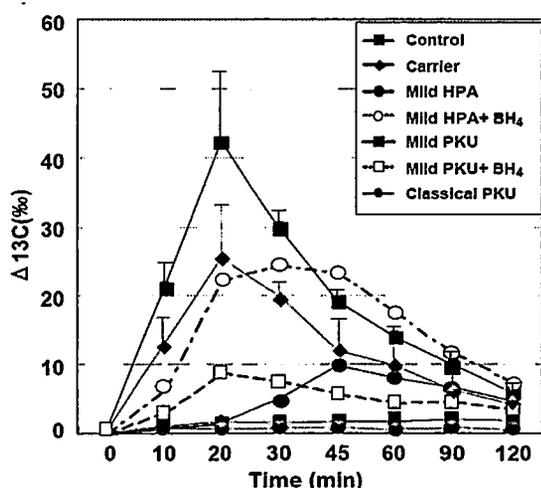


図 3 フェニルアラニン呼気テストにおける $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ の経時的変化

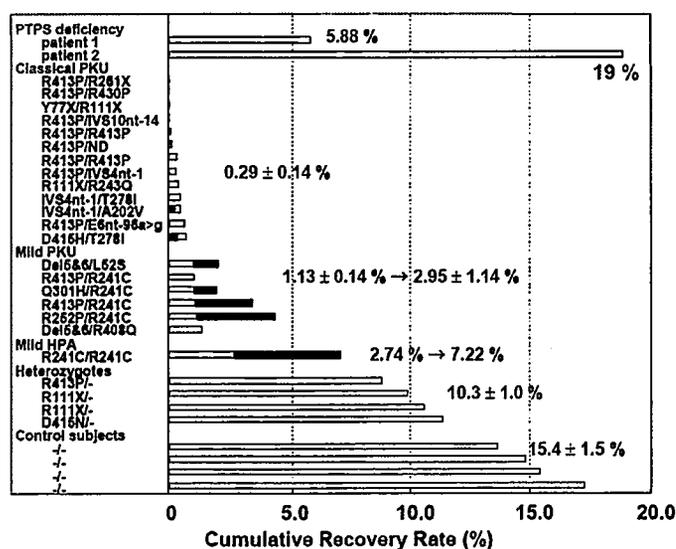


図 4 フェニルアラニン呼気テストにおける累積回収率

最終的に $^{13}\text{CO}_2$ として呼気中に排泄される。呼気テストでは、特別な前提条件や血液サンプリングのような痛みを伴う操作を必要とせず、約2時間の呼気のサンプリングで終了するために、容易にしかも繰り返し行うことができる。フェニルアラニン呼気テストでの CRR 値は、図4に示したように古典型 PKU から軽症型 HPA まで連続している。このことは PKU の臨床表現型が非常に多様であることと一致し、PKU 遺伝子変異の多様性と一致している。事実、本研究においても20人の患者で18の異なる遺伝子変異が認められている。

呼気テストの結果では、それぞれ、古典型 PKU、軽症型 PKU と軽症型 HPA 患者は、1%、1-1.4%、2.4%の有意に異なる CRR 値を示しており、逆に CRR から臨床表現型を決定できると考えられた。Kure らにより軽症型 PKU では BH_4 投与により、血中フェニルアラニン値は低下することが報告されている¹⁾。我々の呼気テストでは CRR1%以上の症例、すなわち、軽症型 PKU、軽症型 HPA 症例に BH_4 反応性が認められた。PTPS 欠損症患者と軽症型 HPA の呼気テストの結果から血中フェニルアラニン値を良好にコントロールするための CRR の目安は5-6%と考えられた。

今回の研究では、臨床表現型、呼気テスト、遺伝子型の3者は各患者で一致しており、不一致例はなかった。PKU の臨床表現型と遺伝子型の関連性が報告²⁾されるとともに、その後その不一致例が多数報告されている。呼気テストは臨床表現型に影響を与える環境因子のうち食事量などの不確定要素を除外することができ、臨床表現型と遺伝子型の不一致例のより詳細な検討に有効である。欧米でのこの呼気テストを利用した臨床表現型と遺伝子型の関連性では Treacy ら³⁾ は呼気テストによる臨床表現型と遺伝子型の不一致、特にヘテロ保因者での不一致例を報告し、Muntau ら⁴⁾ の呼気テストを用いた検討では、軽症型 PKU であっても、また、同じ遺伝子変異であっても BH_4 に反応する場合としない場合があると報告している。その原因として、PAH 側の要因とともに BH_4 側の要因としての BH_4 の生体内への吸収能の個体差、などを含めて今後、検討する必要がある。フェニルアラニン呼気テストは、PKU の臨床型、 BH_4 反応性 PAH 欠損症の診断、および BH_4 投与量の決定に有効であると考えられた。PKU では原則的に臨床表現型と遺伝子型の関連性が認められ、PKU の臨床症状を規定しているのは遺伝子型であるということが明らかである。しかしながら、その不一致例も存在し、何らかの要因が関与しているが、その因子についてはいまだ十分に明らかではなく、その解明は新しい治療法への糸口になる可能性がある。

参考文献：

- 1) Kure S et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-378
- 2) Okano Y et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *New Eng J Med* 1991; 324: 1232-1238,
- 3) Treacy EP et al. Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1- ^{13}C] phenylalanine oxidation rates in vivo: a pilot study. *Pediatr Res* 1997; 42: 430-435
- 4) Muntau AC et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild Phenylketonuria. *N Engl J Med* 2002;347: 2122-2132

作成日：2007年3月9日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

2007年 3月 9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 東 健 

所属機関名： 神戸大学医学部

所属部署： 医学医療国際交流センター 職名： 教授
〒650-0017

所在地： 神戸市中央区楠町7-5-1

電話： 078-382-6308 内線： _____

1. 助成金額： 880,000 円

2. 研究テーマ

日中におけるヘリコバクターピロリ感染の胃発癌リスク解析

3. 成果の概要（100字程度）

日本の研究代表者東が2006年9月に西安を訪問し、中国の共同研究代表者のJun Gong教授を2007年3月に招へいし、日本と中国のピロリ菌感染の現状について討議した。また、日本の沖縄と兵庫県さらに中国の西安で採取された慢性胃炎と胃癌由来のピロリ菌の病原因子CagAの遺伝子を解析したところ、兵庫県と西安では全て東アジア型のCagAを有していた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 東 健 職名： 教授

所属機関： 神戸大学医学部 部署： 医学医療国際交流センター

中国側研究者氏名： Jun Gong 職名： 教授

所属機関： The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University 部署： Department of Gastroenterology

—日中医学協会助成事業—
日中におけるヘリコバクターピロリ感染の胃発癌リスク解析

研究者氏名	東 健
所属機関	神戸大学医学部・教授
中国側共同研究代表者	葉 均
所属機関	中国西安交通大学第二病院・教授

要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*)が胃粘膜上皮細胞に接着すると、CagAが*H. pylori*から胃粘膜上皮細胞内へと注入され、上皮内でCagAがチロシンリン酸化を受け、細胞の増殖や分化に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 SHP-2 と結合する。また、*cagA* 遺伝子は SHP-2 結合部位に一致し多型性を示し、東アジア株に特異的な配列を認め、東アジア型の CagA は欧米型に比べ SHP-2 との結合が強いことを認めた。今回、CagA の多型の臨床的意義を解析するため、胃癌死亡率の異なるアジア地域(男人口 10 万対、兵庫:43.7、沖縄:18.2、中国:36.7)の菌株の CagA を検討した。兵庫株及び中国株の全ては東アジア型の CagA であったが、沖縄では胃炎株の 6 株(14.3%)は CagA 陰性で、8 株(19.0%)が欧米型、28 株(66.7%)が東アジア型の CagA であった。慢性胃炎株では、東アジア型の CagA を有する株の感染例において、CagA 陰性及び欧米型の CagA を有する株の感染例に比べ胃粘膜萎縮度が有意に高度であった。したがって、東アジア型 CagA は胃粘膜萎縮及び胃発癌に関与することが考えられた。

Key Words *Helicobacter pylori*、胃癌、慢性胃炎、CagA

緒言：

*H. pylori*は全世界で人口の50%以上に感染している最も感染率の高い慢性感染症であり、慢性胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃 MALT(mucosa-associated lymphoid tissue)リンパ腫など多くの消化器疾患に関与している。「謎1：どうして*H. pylori*という単独の細菌感染により、病態の異なる多彩な消化器疾患が生じるのか？」

一方、アジア諸国は*H. pylori*感染率はおしなべて高いにもかかわらず、*H. pylori*感染が関与して生じる疾患の種類や頻度は各国により大きく異なっている。*H. pylori*感染は胃癌との関連が認められ、*H. pylori*は1994年に世界保健機構より1群の発癌因子に認定されている。しかし、疫学的研究における*H. pylori*感染による胃癌発症のオッズ比は、約2~23と国や地域により大きく異なる。日本、韓国、中国では胃癌の発症が極めて高いが、フィリピン、タイ、インドネシアでは極めて低い。「謎2：どうして*H. pylori*感染率が一律高いアジアにおいて胃癌の発症率がアジア諸国において異なるのか？」

この*H. pylori*感染の病態の民族差、「謎」、”Ethnical enigma”を明らかにすることが、*H. pylori*感染の病態解明につながると考えられる。*H. pylori*感染におけるこれら疾患の多様性に、*H. pylori*の菌の多様性が関与していることが考えられる。実際、*H. pylori*には遺伝子変異が極めて多いことが明らかにされ、*H. pylori*菌株における疾患特異性が解析されてきている。*H. pylori*のゲノムは、株により大きさ自体約160万から173万塩基対(大腸菌の約44%に相当)と異なる。このことは他の細菌ではみられない特徴的な現象である。*H. pylori*各株は生理・生化学的に共通する安定した性状を示すにも拘わらず、数個の物理的染色体地図の比較により、遺伝子の多型性が認められ、遺伝子の相互位置も大きく異なっている。これは、高い形質転換率を持ち、外因性のDNAが導入されやすいためと

考えられている。1997年にはイギリスの胃炎患者から分離された *H. pylori* 標準株 26695 のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1667867 塩基対で 1590 の遺伝子が認められた。次いで、1999年にはアメリカの十二指腸潰瘍患者から分離された菌株 J99 のゲノムの全塩基配列が決定され、全長 1643831 塩基対で 1495 の遺伝子が認められた。この2つの菌株間では、ゲノム構造は似かよったものであったが、6~7%の遺伝子がそれぞれの株に特異的であった。この違いが、胃炎と十二指腸潰瘍という、それぞれの病態の違いに関与していると考えられている。*H. pylori* はヒトの胃粘膜に特異的に接着し感染している。したがって、ヒトのこれまでの移動と共に、*H. pylori* も地球上を移動してきたと考えられる。*H. pylori* のゲノムを解析すると、*H. pylori* のゲノムの多型性の分布が、人類の起源や移動と一致することが示されてきた。これまで世界各地の菌株 370 株において、8つの遺伝子を選び(7つの構造遺伝子と病原遺伝子である細胞空胞化毒素遺伝子 *vacA*) 塩基配列を解析したところ、世界中の *H. pylori* 菌株は主に5つのグループ(2つのアフリカ株、1つのアジア株、2つのヨーロッパ株)に分けられることが報告されている。我々も、以前、世界7ヶ所の機関との共同研究により、同様な解析を行ったところ、アジア株の特異性を認めた。また、興味深いことに、*H. pylori* の生存に必須の構造遺伝子よりも、*vacA* などの病原遺伝子に菌株間の違いが大きいことが認められた。このことは、単に *H. pylori* がランダムに遺伝子変異を起こすだけでなく、*H. pylori* の生息環境や遺伝子の機能的な作用により選択的に変異が生じてきていることが示唆される。したがって、逆に変異の大きい遺伝子は病原性に関与していることが考えられる。また、*H. pylori* のゲノムには本来 *H. pylori* のものではない外来性の遺伝子群が存在している。これは病原性大腸菌など多くのグラム陰性菌に共通した現象であり、これらの細菌では、この外来性遺伝子群を持つことで病原性を発揮することが認められており、この遺伝子群を病原遺伝子群 (pathogenicity island, PAI) と呼んでいる。*H. pylori* では、病原因子の一つである細胞空胞化毒素関連蛋白(CagA)の遺伝子 *cagA* がこの PAI 内に位置しており、*cagPAI* と呼ばれている。*H. pylori* の *cagPAI* 内には、菌体内から菌体外へ、蛋白をそのままの形で放出する IV 型分泌装置を構成する遺伝子が存在している。我々は、*H. pylori* が胃粘膜上皮細胞に接着すると、IV 型分泌装置が *H. pylori* の細胞膜から上皮細胞膜へ針をさすように突き刺さり、その内腔を通して CagA が *H. pylori* から上皮細胞内へと注入され、上皮内に注入された CagA はチロシンリン酸化を受け、ヒト上皮細胞のシグナル伝達系を攪乱することを世界で初めて明らかにした(1)。また、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化された CagA が、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素 Src homology phosphatase-2 (SHP-2) と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することを発見した(2)。さらに、CagA のチロシンリン酸化部位となるアミノ酸配列(E-P-I-Y-A)モチーフを同定するとともに、リン酸化チロシン残基を含む CagA の SHP-2 結合配列を明らかにした。この SHP-2 結合配列部位に一致して、CagA に分子多型が認められ、大きく東アジア型と欧米型の2つに分けられ、東アジア型の CagA は欧米型の CagA に比べ SHP-2 とより強く結合し、より強い生物活性を発揮することが認められた(3)。したがって、東アジア型の CagA を有する *H. pylori* による感染は、病原性が強く細胞障害を強く生じ、胃粘膜萎縮及び胃発癌に関与することが考えられた。

本研究は、*H. pylori* 感染による胃発癌における日本・中国を中心とした東アジアの特異性を明らかにすることを目的とし、日本と中国で胃発癌死亡率の異なる地域において、*H. pylori* 感染の菌体-宿主-環境相互作用、特に今回、*H. pylori* の病原因子 CagA の分子多型と疾患との関係を民族疫学的に解析した。

対象と方法：

兵庫株 65 株 (慢性胃炎株 36 株、胃癌株 29 株)、沖縄株 67 株 (慢性胃炎株 42 株、胃癌株 25 株)、及び中国 20 株 (慢性胃炎 15 株、胃癌株 5 株) の *cagA* 遺伝子の塩基配列を決定するとともに組織学的解析を行った。西安から Zhao Ping 医師を神戸大学に 2007 年 1 月から 3 ヶ月間招へいし中国株と日本株の *cagA* 遺伝子解析の比較を行った。また、研究代表者の東が 2006 年 9 月に西安を訪問し、現地の

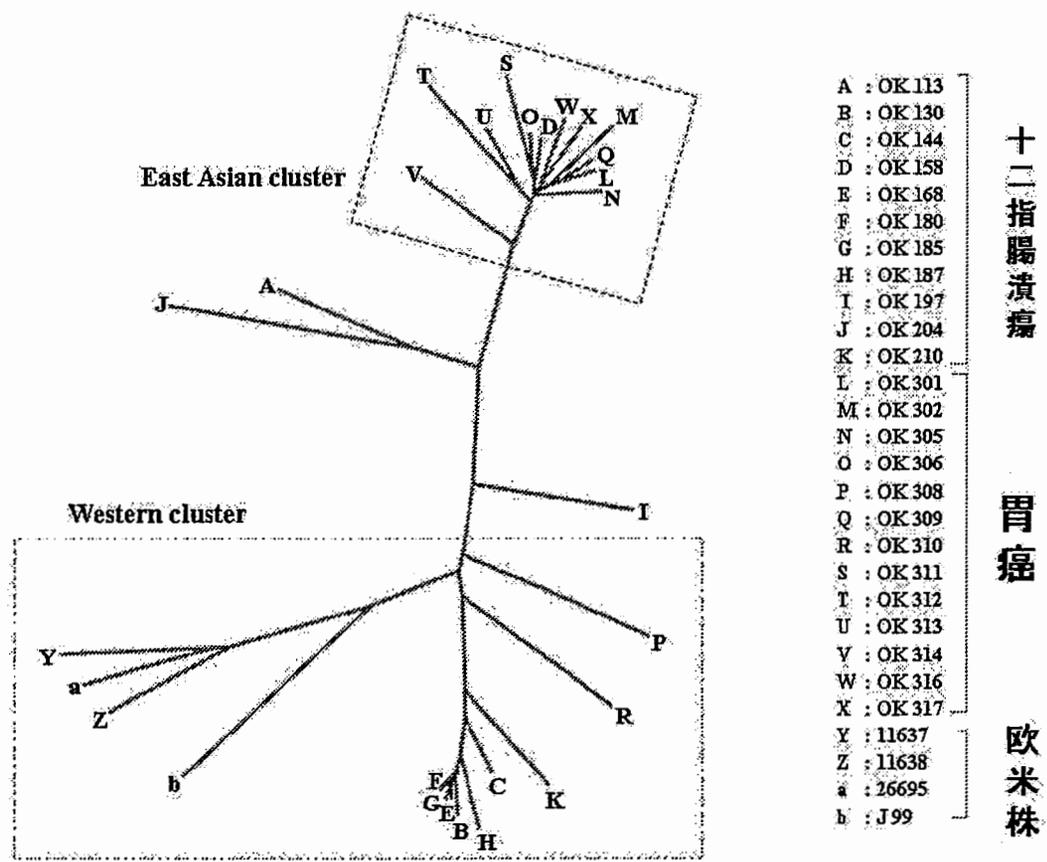
研究者との間で *H. pylori* 感染と胃癌についての中国と日本の違いについて議論し、Jun Gong 教授と Jia Ai 医師が 2007 年 3 月に来日し、中国の *H. pylori* 感染の現状と今後の展望について議論した。

結果：

兵庫株及び中国株の全ては東アジア型の CagA であったが、沖縄では胃炎株の 6 株 (14.3%) は CagA 陰性で、8 株 (19.0%) が欧米型、28 株 (66.7%) が東アジア型の CagA であった (表 1)。慢性胃炎株では、東アジア型の CagA を有する株の感染例において、CagA 陰性及び欧米型の CagA を有する株の感染例に比べ胃粘膜萎縮度が有意に高度であった。興味あることに、兵庫の胃癌株全て及び沖縄のほとんどの胃癌株が東アジア型の CagA を有していた。また、沖縄の十二指腸潰瘍株 11 株、胃癌株 13 株の *cagA* 遺伝子の全塩基配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、胃癌株が東アジアの群を形成し、十二指腸潰瘍株は欧米の群に位置することが示された (図 1)。

表 1 : CagA の多型と疾患

	胃炎由来株			胃癌由来株		
	CagA 陰性	東アジア型	欧米型	CagA 陰性	東アジア	欧米型
兵庫	0	36	29	0	29	0
沖縄	6	28	8	0	23	2
中国	0	15	0	0	5	0



考察：

本検討により、東アジア型の CagA を有する *H. pylori* 感染と胃癌との関連が示唆された。例外として、沖縄の胃癌株で欧米型の CagA を持つ 2 株の、E-P-I-Y-A 繰り返し部位を検討したところ、1 株は A-B-C-C と C が 2 回、もう 1 株は A-B-C-C-C と C が 3 回繰り返された特異な欧米型であった。欧米型の CagA でも SHP-2 結合部位が繰り返されていると SHP-2 との結合も強くなり、東アジア型の A-B-D に近い働きをするものと考えられる。したがって、CagA と SHP-2 との結合が胃粘膜萎縮及び胃発癌の病態に関与することが示唆された。沖縄県が日本で最も胃癌の発症が低い理由の 1 つとして、以上の菌株の違いが関与していると考えられる。また、少なくとも沖縄では、胃癌と十二指腸潰瘍という異なった病態において、感染している *H. pylori* の菌株が異なることが示唆された。

参考文献：

1. Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J Exp Med 191: 593-602, 2000.
2. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science 295: 683-686, 2002.
3. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14428-14433, 2002

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 林 登志雄 

所属機関名： 名古屋大学大学院医学系研究科

所属部署： 老年科学 職名： 講師

〒 486-8550
所在地： 名古屋市昭和区鶴舞町65

電話： 052-744-2363 (直通) 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

アジア人における高齢者動脈硬化性疾患発症予防のための日中メタボリック症候群罹患高齢者女性調査

3. 成果の概要 (100字程度)

中国(成都,昆明),日本(名古屋)で,678,629名の閉経後女性(48-83歳)の成績を得た。ホルモン補充療法,幸福感,リビングウイル等のアンケートを施行し,HRTは日本4%,中国0%だった。日本は中国より,外出,趣味が少なく幸福感が低かった。メタボリック症候群はNCEP-ATPIII,中国糖尿病学会、日本の基準で中国、27.3、23.3、13.7%、日本は12.5、11.1、5.9%であった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 林 登志雄 職名： 講師

所属機関： 名古屋大学大学院医学系研究科 部署： 老年科学

中国側研究者氏名： 丁群芳 職名： 助教授

所属機関： 四川大学華西病院 部署： 老人科

アジア人における高齢者動脈硬化性疾患発症予防のための 日中メタボリック症候群罹患高齢者女性調査

研究者氏名	林 登志雄
所属機関	名古屋大学大学院医学系研究科老年科学講師
共同研究者	丁 群芳
所属機関	四川大学華西病院老人科助教授

背景：

閉経後女性には動脈硬化症が急激に進行する。特に糖尿病罹患女性ではそのリスクが非常に強く、男性の三倍にも及ぶ事が Framingham Study (20 年以上も前から現在も続いている日米両国のコホート研究) や久山町研究 (1961 年以来続いている九州大学の疫学調査) から明らかである。

一方、近年メタボリック症候群になると冠動脈疾患に罹患するリスクが高いことが内外で注目されている。名古屋大学医学部老年科と中国四川医科大学老年科の予備検討では、両国には高齢者のメタボリック症候群罹患率が少なくないことが推測された。しかし、現在提唱されている診断基準は、WHO (国際保健機関) による基準、NCEP-ATPIII (米国コレステロール教育計画) による基準、IDF (国際糖尿病連盟) による基準が国際的に良く知られているが、中国は中国糖尿病学会による基準、日本は 8 学会による診断基準を独自に定めている。各々はベースとするところが異なり、女性のウエスト比などの定義が異なる為、適用する診断基準により該当者数にかなりの差が出ることは知られている。

意義：

アジア民族は人口も非常に多く、遺伝的にも栄養環境面からも欧米とはかなり異なる上に、民族間の共通するものが多い事が知られているにもかかわらず共同研究は少ない。遺伝、環境をふくめた総合的視野でメタボリック症候群を検討し、その病態を明らかにし治療法を特に女性に注目して考えたい。

方法：

本検討では両国 600~700 名ずつの高齢女性を登録し、

- 1) 4 種類の診断基準 (NCEP-ATPIII、IDF、中国、日本) によるメタボリック症候群該当者を検討する。各々の患者背景、脂質、糖代謝、血圧変動、BMI、腹囲等を検討し、診断基準の特性、アジア人への適応性を検討する。
- 2) 次にメタボリック症候群罹患候補遺伝子凝固線溶遺伝子 (PAI-1) PPAR α , γ 、イボサイトカイン受容体遺伝子の関与を検討する。本邦高齢者の女性ホルモンエストロゲン受容体 ER α , β の変異、及びチトクローム P450 アイソフォーム等の代謝酵素系の遺伝子素因も検討する。これらより、報告されている欧米とアジア民族の人種的メタボリック症候群罹患候補遺伝子に関連する背景の差を考える。
- 3) 次に治療について女性ホルモンの関与から考える。即ち、糖尿病で認められるように、閉経後の心血管病のリスクが非常に高くなる事から、女性ホルモンが各生活習慣病に関与している度合いを検討して、現在メタボリック症候群に使用されている薬剤を実態調査するとともに、スタチン製剤、フィブラート製剤、各種降圧剤等で相応しいものを検討する。また、HRT については 12 万人に及ぶ米国の看護師対象の試験では、HRT により虚血性心疾患 (IHD) 罹患率が 50% 以下になり、欧米での HRT 実施率は約 40% に至った。しかし、99 年発表の HERS では、IHD 罹患率における二次予防に対して、2001 年発表の WHI では、健常女性 (但し BMI28, 高血圧治療者 40%) の IHD 一次予防に対しても有効性が認められず、米国では HRT の新規施行は激減した。その主因は、子宮体癌予防を目的としたプロゲステロン併用によるエストロゲン作用の相殺と、動静脈における血栓形成の増加であるが、韓国では血栓形成の人種差を

考慮しHRTを今なお推奨する声がある事も考慮したい。即ち、2)における欧米とアジアとの遺伝的背景が明らかになれば、女性ホルモンの病態への寄与、血栓形成性についてオリエンタル独自の所見が得られる可能性もあると考えている。

結 果：

中国(成都,昆明)で678名、日本(名古屋)で629名の閉経後女性(48~83歳)の成績を得た。(古くから、東海に成都・昆明の留学生が来ており一緒に研究を行った為対象とした。)アンケートはホルモン補充療法に加え、幸福感、うつ尺度、高齢者総合機能評価、リビングウイルに至る広範な範囲を網羅した。HRT施行率は日本4%、中国0%であった。中医療法にても血中濃度より女性ホルモン様薬剤は認めなかった。日本は中国より、外出、運動、趣味が少なく幸福感が低かった。メタボリック症候群は、NCEP-ATPIII、IDF、中国、日本の基準で、中国が27.3%、37.3%、23.3%、13.7%、日本は12.5%、15.9%、11.1%、5.9%であった。

遺伝子解析では中国が血液、DNAの海外持ち出しを禁じており、共同研究者と解析システムを構築した。血栓関連として凝固V因子-Leiden変異、プロトロンビンG20210変異等、凝固線溶関連-plasminogen activator inhibitor-1遺伝子等、内皮機能関連-eNOS、Estrogen receptor α , β 等、代謝関連-PPAR α 等17種のSNPを解析し増やしている。アジア諸国は殆ど共通の分布を示したが、PAI-1, ER α , eNOS等に国別、地域別の差を認める傾向にあり精査している。採血は更にサイトカイン(Adiponectin, IL-6)等も行った。

- | | |
|---|--------------------------|
| 1. PPAR alpha L162V | 2. PPAR gamma Pro 12 Ala |
| 3. PAI-1 4G/5G | 4. TNF alpha -380 G/A |
| 5. ADIPOR1 -8530 G/A | 6. ESR alpha PvuII; XbaI |
| 7. ESR beta RsaI(1082 G>A); AluI(1730 A>G). | |
| 8. Factor V Leiden | 9. Factor VII |

まとめ：

得られた成果はこれまで明らかになっている欧米での成績と比較し、アジア人に有効な或は本邦や中国人各々に有効なメタボリック症候群の治療法の確立をめざす。

業 績 (関連分を含む)

- 1: Hayashi T, Esaki T, Sumi D, Mukherjee T, Iguchi A, Chaudhuri G. Modulating role of estradiol on arginase II expression in hyper-lipidemic rabbits as an atheroprotective mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:10485-90. (press release)
- 2: Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding QF, Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro LJ, Iguchi A. Endothelial Cellular Senescence is Inhibited by Nitric Oxide -Implications in Atherosclerosis Associated with Menopause and Diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 ;103:17018-23.
- 3: Ding Qunfang, Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Iguchi A, Ignarro LJ. Risks of CHD identified by different criteria of metabolic syndrome and related changes of adipocytokines in elderly post menopausal women. J Diabetes and its Complication (in press)
- 4: Osawa M, Hayashi T, Nomura H, Funami J, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi Nitric oxide (NO) is a new clinical biomarker of survival in the elderly patients and its efficacy might be nearly equal to albumin. Nitric Oxide. 2007;16:157-163, Epub 2006 Oct30
- 5: Miyazaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF, Shiraishi H, Nomura T, Hattori Y, Iguchi A. 17beta-estradiol Antagonizes the Down-Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase and GTP Cyclohydrolase by High Glucose: Relevance to Postmenopausal Diabetic Cardiovascular Disease. J Pharmacol Exp Ther. 2007;320:591-598 Epub 2006 Nov.2
- 6: Hayashi T, Nomura H, Osawa M, Miyazaki A, Funami J, Matsui-Hirai H, Iguchi A. Nitric oxide (NO) metabolites are associated with survival in older patients—comparison of its efficacy with established markers. J Am Geriatric Soc. (in press)

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—調査・共同研究—報告書

19年 3月 13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 坂東 春美



所属機関名： 大阪教育大学大学院 健康科学専攻

所属部署： 人間生態学研究 職名： 大学院生
〒 543-0054

所在地： 大阪府大阪市天王寺区南河堀町4-88

電話： 06-67756634

内線：

1. 助成金額： 300,000 円

2. 研究テーマ

日本と中国における、幼稚園児の家庭内受動喫煙に関する実態調査

3. 成果の概要（100字程度）

健康被害を防止するため、子どもの家庭内における受動喫煙環境の実態把握を、目的とした。日本女性の喫煙率の高さが認められ、喫煙を開始することが防げる防煙教育の重要性、子どもの前での喫煙に対する啓発の必要性、家族全体を含んだ啓発が必要であると思われる。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 坂東 春美 職名： 大学院生

所属機関： 大阪教育大学大学院 健康科学専攻 部署： 人間生態学研究室

中国側研究者氏名： 宋 江莉 職名： 幹事

所属機関： 中華護理学会 部署：

日本と中国における、幼稚園児の家庭内受動喫煙に関する実態調査

日本側代表

研究者氏名 坂東 春美

日本研究機関 大阪教育大学大学院

中国側代表研究者

研究者氏名 宋 江莉

中国研究機関 中華護理学会

要旨

目的：健康被害を防止するため、子どもの家庭内における受動喫煙環境の実態把握を目的とする。

方法：日本のA市と中国の北京に在住の幼稚園（保育園も含む）に通う子どもを調査対象とし、その保護者に質問紙調査を実施した。各園より質問紙と返信封筒を配布、その後各幼稚園に持参してもらい回収した。1.母親及び父親の年齢や同居家族の有無の家庭背景、2.家庭内喫煙者の有無や家庭内受動喫煙の有無の喫煙環境、3.子どもの健康問題の有症状に関する子どもの健康状態、4.妊娠期や授乳期における母親の喫煙状態に関する、胎児期および乳児期における環境を質問項目とし、受動喫煙との関連を分析した。

結果：母親の喫煙は、妊娠期や授乳期において日本の母親が高い割合であった($p<0.01$)。現在の母親の喫煙も、日本の母親の喫煙率が高い割合であった($p<0.01$)。父親の喫煙は、日本と中国の喫煙率に差はなかった。

子どもの健康に関する有症状では、日本は受動喫煙ありの者で、食欲がない者と偏食のある者に高い割合で認められた($p<0.05$)。中国は、有症状の項目で差の認められるものはなかった。

結論：日本女性の喫煙率の高さが認められ、喫煙を開始することが防げる防煙教育も重要ではないかと考える。父親や母親ともに両国で子どもの前で喫煙を行っている者が30%以上認められ、子どもの前での喫煙に対する受動喫煙の啓発が必要であると考えられる。また、同居家族がいる世帯では喫煙率が両国で高率になる傾向がある。子どもの受動喫煙が危惧され、父親や母親に対する受動喫煙の啓発にとどまらず、家族全体を含んだ啓発が必要であると思われる

Key Words 喫煙 受動喫煙 防煙教育 啓発

I. 緒言

わが国の喫煙率は、「平成17年全国たばこ喫煙者率調査」¹⁾によると成人男性の平均喫煙率は45.8%で、成人女性の平均喫煙率は13.8%という結果になっている。また、中国の喫煙率は男性66.9%、女性4.2%である²⁾。次に、日本の紙巻たばこの総販売本数は¹⁾、2002(平成14)年には、3,126億本で平成9年をピークに減少傾向を示しているが、昭和40年と比較すると約2倍の販売本数となり、世界的にも紙巻たばこ消費量は第3位の消費国である。中国では、紙巻たばこの総販売本数は16430億本であり世界で最大の消費量となっている²⁾。ここから、日本と中国の喫煙が大変身近な環境であることが伺える。

次に、喫煙に起因する健康被害は近年様々に挙げられている。Mullerが1939年に喫煙と肺がんに関する報告から始まり³⁾、2005年Dollらの調査においても喫煙と肺がん等28種のがんにおける関連が述べられている⁴⁾。

さらに、環境たばこ煙の健康被害も報告されており⁵⁾、がんや虚血性心疾患・喘息を始めとする呼吸器疾患の報告がなされており⁶⁾、能動喫煙と類似した疾患の関連性が伺える。

また、喫煙はこれらにと留まらず、胎児への影響も報告されている。妊婦自身の能動喫煙と、受動喫煙とがあり、胎児はいずれの場合も子宮内受動喫煙とよばれ⁶⁾、低出生体重児の研究報告や⁷⁾、乳幼児突然死症候群 (SIDS)⁸⁾による死亡率の上昇が多く報告されている。

これらのことから喫煙は、能動喫煙者ならびに受動喫煙者において、子どもたちの大きな健康被害がもたらされる可能性が考えられる。こうした報告のなかで、わが国や中国における喫煙環境を考慮すると、成育環境における状況が危惧される。

次世代への喫煙による健康被害を防止するため、子どもの家庭内における受動喫煙環境の実態把握を、目的とした。

II.対象と方法

1. 調査対象

日本の A 市と中国の北京に在住の幼稚園 (保育園も含む) に通う子どもの保護者に質問紙調査を実施する

2. 調査方法

平成 18 年度中に両国の調査対象者に、各園より質問紙と返信封筒を配布、その後各幼稚園に持参してもらい回収した。

3. 主な調査内容

①家庭背景 ・母親と父親の年齢・同居家族の有無

②喫煙環境 ・家庭内の喫煙者の有無・家庭内の受動喫煙の状況・喫煙者の喫煙場所

③子どもの健康状態

・子どもに関する有症状の状況

(健康状態、喘息、アレルギー、眼や耳鼻の症状、アトピー、咳等呼吸器症状、心臓疾患、胃腸の症状、発達がゆっくり、泌尿器の症状、その他の症状、睡眠の状態、食欲の状態、偏食、通園状況、他児との関係の各項目の有無)

④胎児期および乳児期における環境

・子どもの妊娠時における母親の喫煙

・授乳期における喫煙状況

に関して質問を行った。

4. 分析方法

上記の質問紙の情報より家庭内喫煙による子どもの健康特徴を把握し、さらに両国の相違による健康状況を比較する。

分析には、統計解析ソフトウェアの SPSS を使用し、 χ^2 検定を行った。

5. 研究上の倫理

本研究は、家庭や生活上の環境と健康とのかかわりを明らかにするために行い、調査対象者の個人の尊厳と人権を守り個人情報の取り扱いに対し、厳重に注意を払い行う。また、この旨の説明を調査票上にも表記し、了承の得られた者のみに実施を行った。

III.結果

平成 18 年 7 月 1 日から同年 10 月 15 日までに自記式質問紙を配布し回収を実施した。日本では、2000 年から 2002 年度生まれで幼稚園 (保育園も含む) 在園児 975 人を対象に調査を行い 583 人(59.8%)回収し、中国では、2000 年から 2002 年度生まれで幼稚園在園児 1021 人を対象に調査を行い 632 人(61.9%)回収した。

子どもの性別は、日本は男性 297 人(50.9%)、女性 286 人(49.1%)であった。中国は、男性 358 人(56.6%)、

女性 274 人(43.4%)であった。

母親の年齢は、日本の平均年齢は 33.9±4.3 歳、21 歳から 46 歳であった。中国の平均年齢は 32.9±3.7 歳、22 歳から 49 歳であった。父親の平均年齢は、日本の平均年齢は 35.6±5.1 歳、23 歳から 64 歳であった。中国の平均年齢は、35.4±4.4 歳、26 歳から 59 歳であった。父親、母親以外の同居家族がいる割合は、日本は 109 人(18.7%)、中国は 99 人(15.7%)であった。

母親の妊娠期における喫煙は、日本は 59 人(10.1%)、中国は 1 人(0.2%)であり、授乳期では、日本は 53 人(9.1%)、中国は 1 人(0.2%)と、妊娠期や授乳期における喫煙率は日本の母親が高い割合であった(p<0.01)。現在の母親の喫煙も、日本は 96 人(16.5%)、中国は 60 人(0.9%)と日本の母親の喫煙率が高い割合であった(p<0.01)。喫煙場所では、子どもの前での喫煙は、日本では 29 人(33.3%)、中国では 2 人(33.3%)であった。

父親の喫煙は、日本は 283 人(48.5%)で、中国は 305 人(48.3%)と喫煙率に差はなかった。喫煙場所では、子どもの前での喫煙は、日本は 87 人(32.6%)、中国は 90 人(31.1%)であった。

母親や父親と同居家族を含めた家庭内での喫煙者がいる割合では、日本は 322 人(55.2%)、中国は 318 人(50.3%)であった。家庭内での喫煙者が子どもの前での喫煙は、日本は 105 人(18.0%)で、中国は 93 人(14.7%)であった。

子どもの健康状態で不調であると答えたのは、日本は 151 人(25.9%)、中国は 159 人(25.2%)であった(表 1)(表 2)。子どもの健康に関する有症状では、日本は受動喫煙ありの者で、食欲がない割合が 18 人(27.7%)と、偏食のある者の割合が 43 人(23.8%)で高い割合で認められた(p<0.05)。中国は、有症状の項目で差の認められるものはなかった(表 1)(表 2)。

表 1 日本の子どもにおける有症状

		受動喫煙あり		受動喫煙なし		合計	χ ² 検定
		n	%	n	%		
子ども健康状態	健康	79	18.5	348	81.5	427	n.s
	不調	24	15.9	127	84.1	151	
喘息	なし	100	18.1	451	81.9	551	n.s
	あり	5	15.6	27	84.4	32	
アレルギー	なし	91	17.4	431	82.6	522	n.s
	あり	14	23.0	47	77.0	61	
眼や耳鼻の症状	なし	101	18.0	459	82.0	560	n.s
	あり	4	17.4	19	82.6	23	
アトピー	なし	96	18.3	430	81.7	526	n.s
	あり	9	15.8	48	84.2	57	
咳や呼吸器の症状	なし	103	18.1	465	81.9	568	n.s
	あり	2	13.3	13	86.7	15	
心臓病	なし	105	18.1	476	81.9	581	n.s
	あり	0	0.0	2	100.0	2	
胃腸の症状	なし	104	17.9	478	82.1	582	n.s
	あり	1	100.0	0	0.0	1	
発達がゆっくりである	なし	103	18.1	465	81.9	568	n.s
	あり	2	13.3	13	86.7	15	
		2	13.3	13	86.7	15	
泌尿器の症状	なし	105	18.1	474	81.9	579	n.s
	あり	0	0.0	4	100.0	4	
その他	なし	102	18.0	466	82.0	568	n.s
	あり	3	20.0	12	80.0	15	
睡眠の状態	良好	51	16.4	260	83.6	311	n.s
	普通	49	19.8	198	80.2	247	
	良くない	5	20.8	19	79.2	24	
食欲	よい	31	13.8	193	86.2	224	*
	普通	55	18.8	237	81.2	292	
	よくない	18	27.7	47	72.3	65	
偏食	なし	62	15.6	336	84.4	398	*
	あり	43	23.8	138	76.2	181	
通園状況	ほとんど休まない	87	17.6	407	82.4	494	n.s
	1月に2~4日休む	17	20.2	67	79.8	84	
	1月に5日以上休む	1	25.0	3	75.0	4	
友達との関係	よい	53	17.4	252	82.6	305	n.s
	普通	50	18.5	220	81.5	270	
	よくない	1	25.0	3	75.0	4	

表 2 中国の子どもにおける有症状

		受動喫煙あり		受動喫煙なし		合計	χ ² 検定
		n	%	n	%		
子ども健康状態	健康	72	15.4	396	84.6	468	n.s
	不調	21	13.2	138	86.8	159	
喘息	なし	92	14.8	530	85.2	622	n.s
	あり	1	10	9	90	10	
アレルギー	なし	89	14.5	526	85.5	615	n.s
	あり	4	23.5	13	76.5	17	
眼や耳鼻の症状	なし	91	14.7	526	85.3	617	n.s
	あり	2	13.3	13	86.7	15	
アトピー	なし	92	14.7	532	85.3	624	n.s
	あり	1	12.5	7	87.5	8	
咳や呼吸器の症状	なし	75	15.2	420	84.8	495	n.s
	あり	18	13.1	119	86.9	137	
心臓病	なし	92	14.6	539	85.4	631	n.s
	あり	1	100	0	0	1	
胃腸の症状	なし	92	14.9	527	85.1	619	n.s
	あり	1	7.7	12	92.3	13	
発達がゆっくりである	なし	93	14.7	539	85.3	632	n.s
	あり	0	0	0	0	0	
		92	14.7	532	85.3	624	n.s
泌尿器の症状	なし	1	12.5	7	87.5	8	
	あり	93	14.8	535	85.2	628	n.s
その他	なし	0	0	4	100	4	
	あり						
睡眠の状態	良好	76	14.7	441	85.3	517	n.s
	普通	17	14.9	97	85.1	114	
	良くない	0	0	0	0	0	
食欲	よい	70	16.4	358	83.6	428	n.s
	普通	21	10.8	174	89.2	195	
	よくない	2	28.6	5	71.4	7	
偏食	なし	80	14.4	474	85.6	554	n.s
	あり	12	16.4	61	83.6	73	
通園状況	ほとんど休まない	78	15.7	420	84.3	498	n.s
	1月に2~4日休む	15	13.3	98	86.7	113	
	1月に5日以上休む	0	0	17	100	17	
友達との関係	よい	79	15.3	439	84.7	518	n.s
	普通	14	13.3	91	86.7	105	
	よくない	0	0	5	100	5	

IV.考察

妊娠期及び授乳期において、日本女性の喫煙率の高さが認められた。これは、妊娠中の受診機関における禁煙支援の強化も必要と言えるが、妊娠前からの喫煙習慣があり、禁煙が困難になっている可能性が考えられる。このことから、喫煙を開始することが防げる防煙教育も重要ではないかと考える。近年は、喫煙開始が未成年期に及び、防煙教育の早期介入を実施することが必要であり学校教育との連携が大切と考える。中国の女性における喫煙率は、日本の女性に比較して低率ではあったが今後も喫煙者の増加につながるためにも、同様に防煙教育の早期介入が重要ではないかと思われる。

父親の喫煙率において両国の差は認められなかったが、父親や母親ともに両国で子どもの前で喫煙を行っている者が30%以上認められた。今回の調査においては、子どもの成長発達に多くの影響を示すものは認められなかったが、受動喫煙の影響が報告されていることから子どもの前での喫煙に対する啓発が必要であると考えられる。

次に、同居家族がいる世帯では喫煙率が両国で高率になる傾向がある。さらには、同居家族のいる世帯では子どもの前での喫煙をしている者の割合が高まり、子どもの受動喫煙が危惧される。ここから、父親や母親に対する受動喫煙の啓発にとどまらず、家族全体を含んだ啓発が必要であると思われる。また、世帯の中で喫煙者が存在する事は、子どもにとって喫煙が大変身近であり喫煙行動そのものが抵抗無く定着しやすい環境下であるとも考えられる。家族の喫煙行動が、次世代の喫煙者を生むきっかけとなり世代間連鎖を断ち切るためにも、世帯単位や家族単位での禁煙支援も重要であると考えられる。

子どもの有症状において、中国では受動喫煙との関連は認められなかったが、日本においては受動喫煙者のうち、食欲がない者と、偏食のある者が高い割合で認められた。こうした背景に関連するものは今回の調査では把握できていないが、成長発達の活発な時期であり栄養摂取における影響を及ぼす可能性が考えられ、今後も調査を重ねて明らかにする必要があると思われる。

おわりに

今回、調査実施にあたり日本及び中国の方々のご協力とご理解を賜りましたこと、また多岐にわたりご指導いただきました、福井医科大学名誉教授、緒方昭先生に厚くお礼申し上げます。

本研究に対してご助成を賜りました、財団法人日中医学協会に対し深く感謝申し上げます。

作成日：平成19年3月13日

引用文献

- 1) 平成17年全国たばこ喫煙者率調査, 日本たばこ産業株式会社による調査より
- 2) The Tobacco ATLAS. 財団法人 日本公衆衛生協会
- 3) Muller F H. Tabakmissbrauch und Lungencarcinom. Z Krebsforsch1939;49:57-85.
- 4) Doll, Richard; Bradford Hill, Austin :Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. Br J Cancer. 2005 Feb 14;92(3):426-9.
- 5) Hirayama, T. Nonsmoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer : a study from Japan. Br. Med. J. 282 : 183-185, 1981.
- 6) 厚生省編:新版喫煙と健康;喫煙と健康問題に関する検討会報告書, 第2版. 保健同人社:
- 7) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局:平成12年乳幼児身体発育調査報告書, 2001.
- 8) Blair PS, Fleming PJ, Bensley D, Smith I, Bacon C, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J: Smoking and the sudden infant death syndrome: results from 1993-5 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. Confidential Enquiry into Stillbirths and Deaths Regional Coordinators and Researchers. BMJ 313(7051):195-198, 1996.

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 1月 31日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 村上 政隆



所属機関名： 自然科学研究機構生理学研究所

所属部署： 細胞器官研究系 職名： 助教授
〒444-8787

所在地： 愛知県岡崎市明大寺町東山字5-1

電話： 0564-59-5268 内線：

1. 助成金額： 720,000 円

2. 研究テーマ

漢方薬の唾液分泌増強機構の調査研究

3. 成果の概要 (100字程度)

唾液分泌低下治療に効果を有す漢方薬の唾液腺に対する分泌増強効果を
摘出ラット顎下腺血管灌流標本の水分分泌速度を測定し調査研究した。
直接作用をもたらした15種の薬物の分泌増強反応は3つのパターンに分
かれ、漢方薬の分類に対応した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 村上 政隆 職名： 助教授

所属機関： 自然科学研究機構生理学研究所 部署： 細胞器官研究系

中国側研究者氏名： 丁 焯 職名： 助教授

所属機関： 南京医科大学第一付属病院 部署： 中医内科

漢方薬の唾液分泌増強機構の調査研究

研究者氏名	村上政隆
中国所属機関	南京医科大学附属第一病院中医内科
日本研究機関	自然科学研究機構生理学研究所 細胞器官研究系
指導責任者	助教授 村上政隆
共同研究者名	丁 煒、魏 睦新

要旨：

唾液分泌低下治療に効果のある漢方薬が直接唾液腺に作用するのか？また分泌を誘発するのか唾液水分分泌を増強するのかを調べるため、摘出ラット顎下腺の血管灌流標本の水分分泌速度を測定した。成体ラットから顎下腺を摘出、血管灌流標本を作製。分泌導管にカニューレを施しこれを電子天秤上のカップに導き、分泌された唾液重量を経時的に計測しコンピュータに転送、実験後データを時間微分して分泌速度を求めた。漢方薬は20種類を用いた。薬物は治療血液濃度になる様、灌流液中に添加溶解した。対照刺激として5分間のカルバコールを投与し分泌を観測した。対照分泌は初期30秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに増加し5分で持続期に入る分泌持続相に分かれた。薬物を灌流系より洗い流し、漢方薬単独を加えたが一例を除き19の漢方薬は唾液分泌を誘発できなかった。漢方薬添加後5分で灌流液にカルバコールを重畳すると15種類で唾液分泌の増強が観察された。いずれも初期相には影響がなく、分泌持続相の分泌速度を増強させた。5種の薬物が増強効果を持たず、ヒトでは分泌増加を起こす理由は神経活動の変化によると推定された。唾液腺に直接作用をもたらす15種の薬物による分泌増強反応は3つのパターンに分かれた。このパターンは用いた漢方薬の分類 (I) 養陰剤、(II) 補気剤、(III) 活血剤と対応した。唾液増強をもたらす漢方薬の作用機序を西洋医学的手法により調査することは唾液分泌機序研究の新しい方法になるばかりでなく、唾液分泌の改善のために中国医学の経験を結びつけ全身効果を考慮した漢方薬治療法の西洋医学との融合が生まれる可能性がある。

Key Words：唾液分泌減少症、ラット摘出灌流顎下腺、水分分泌測定、漢方薬、分泌増強効果

緒言：

口腔乾燥症 Xerostomia、Dry Mouth は 唾液分泌低下によって引き起こされる状態をいう。口腔乾燥症になると、口腔粘膜の痛み、食物の嚥下困難、口腔内感染を起こし、口腔内が不潔になり、う歯の発生を助長する。ことに高齢者の場合、口腔乾燥症が全身状態の低下を誘発し、重篤な疾病につながることもある。唾液分泌低下の原因は、1) 体液浸透圧の上昇、交感神経系の優位な興奮状態など日々の生理的な体調の変動による場合、2) 老人性の唾液腺分泌能の低下、3) 向精神薬、降圧剤などの投薬による副作用としての唾液分泌低下、4) 放射線治療による唾液腺分泌終末部の障害による唾液分泌低下、5) シェーグレン症候群、嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis)など唾液腺の疾病による分泌低下があげられるが、A) 唾液腺そのものに病因がある場合と、B) 唾液腺に影響を及ぼす神経系、内分泌系、循環系の作用の総体として分泌低下につながる場合、の大きく二つに分かれる。

唾液腺の水分分泌は、副交感神経/交感神経の活動および生理活性物質の作用により誘発される。これは二つの経路を通過する水分移動の総和である。ひとつは、分泌終末部細胞(腺房細胞など)が塩素イオンを能動的に分泌しこれに細胞内からの水分の浸透流が伴う経細胞輸送であり、もうひとつは細胞間隙を細胞結合部 tight junction を超える水の移動、すなわち傍細胞輸送である[1、2]。神経活動/生理活

性物質の作用がなければ分泌は起こらない。口腔乾燥症の広範な原因を理解し、これを治療に結びつけるためには、分泌終末部細胞の分泌機構のみを理解することだけでなく、細胞同士の間を水が通過する調節機構、循環系からの水分の補給経路、神経系／内分泌系による水分分泌調節を理解することが極めて重要である。しかし細胞レベルの理解と神経系／内分泌系を直接結びつけることは困難である。そこで、細胞レベルの理解をまず複合細胞系に持ち込み、分泌測定が可能な実験系として、唾液腺を個体から切り離し、血管灌流により循環を維持し、分泌機能、細胞機能を評価する実験系[3]を用いることとした。この実験系の利点は灌流液に生理活性物質を添加することで唾液腺の状態を分泌活動も含め調節することができ、唾液導管にチューブを挿入し分泌唾液を採取することによりその化学組成を分析できる。また分泌された唾液を延長チューブで電子天秤に導き、分泌唾液重量を計時的に測定することが可能であり、唾液の水分分泌速度の時間的変化を評価できる。また、腺を個体から完全に切り離していることにより、神経系／内分泌系からの影響を一切受けなくて分泌機能を評価できる利点がある。

唾液分泌低下に対する治療法は、原因となる疾病の治療が優先されるが、原因不明の場合や放射線により不可逆変化が唾液腺に起こっている場合、治療中の投薬を停止できない場合、老人性の唾液腺変化による場合には、人工唾液の服用（飲水）のみに頼らざるを得ない。しかし、人工唾液の服用（飲水）を会話中に行う不便さなどがありQOL(Quality of Life)の向上のために唾液分泌低下に対する治療が求められている。ここで中国の数千年にわたる漢方薬の治療効果の調査と実験を行う動機がある。唾液分泌低下に対して治療効果のある漢方薬が多く知られているが、これらの薬物が直接唾液腺に作用するのかどうか？また直接作用があるとすれば、唾液を誘発するのかあるいは唾液水分分泌速度を増強するのかを 摘出ラット顎下腺の血管灌流標本を用い、水分分泌速度を測定し検討した。予備実験と今回の共同研究により、従来より唾液分泌促進効果が知られている 20 種類の漢方薬について唾液分泌に及ぼす影響を検討した。

対象と方法：

材料：Wistar 系 雄性ラット (Slc: Wistar/ST, SLC, 浜松) 9 週令 (240-290g) を用いた。Pentobarbitone Na (50 mg/kg 体重) の腹腔注射により全身麻酔を施し動物から顎下腺を摘出した[4]。灌流動脈に施したカニューレより 2ml/min の一定流速で人工灌流液を灌流する血管灌流標本を作製し、37℃の恒温チェンバーに設置した。静脈は切り離し、流出灌流液は自由に排出させた。分泌導管には、フッ化樹脂製チューブ（内径 0.3mm x 外径 0.5mm、EXLON™）カニューレを施した。挿入前にあらかじめチューブの内腔を生理食塩水で満たし、電子天秤(AEG220, Shimadzu) 上のカップに満たした水の水面下に導き、水分のみの移動を電子天秤が重量として感知するようにした。すなわち分泌されつつある唾液の重量を経時的に計測しコンピュータ (Librett20, Toshiba) に転送 (RS-232C)、実験後データを時間微分して分泌速度を求めた (Excel, Microsoft)。

灌流液の組成は、NaCl 140 mM、KCl 4.3 mM、CaCl₂ 1 mM、MgCl₂ 1 mM、glucose 1 mM とし、HEPES 10 mM を加え 1N NaOH にて pH7.4 に調整した。唾液分泌刺激のコントロールとしてムスカリニック受容体を刺激する Calbamylocholine (Sigma, MO;カルバコール) を 0.2 μM の濃度で用いた。

漢方薬は、玄参、地黄、沙参、天花粉、葛根など 20 種類を用いた (表)。薬物は灌流液中に治療血液濃度になる様に入れ、攪拌後遠沈、上清を 0.45 ミクロンフィルターで濾過し試験液として使用した。

実験プロトコール：薬剤の効果として、a) 直接唾液分泌を誘発する効果があるのか、b) 通常の分泌刺激を増強する効果があるのか、を検討するために、同じ唾液腺を用い、以下の連続した 3 つの実験を行った。

- 1) 用いた唾液腺の分泌能をカルバコール単独刺激で測定する。
- 2) 用いた唾液腺の漢方薬単独の分泌誘発効果を測定する。
- 3) 漢方薬の分泌増強効果を、あらかじめ漢方薬を灌流している状態でカルバコールの分泌刺激を行い、分泌時間経過を測定する。

カルバコールの濃度を 1 μM を用いると supra-maximal の刺激となる。本実験では、漢方薬の分泌増強効

果を検討するために 0.2 μM の中程度の刺激を用いた[5]。

上記 1) -3) の実験前までに腺の灌流状態を安定させるために、20 分間の刺激剤を含まない灌流をおこなった。このときに無刺激での唾液分泌はいずれの腺でも観察されなかった。

結果：

- 1) 対照刺激として最初 5 分間のカルバコール刺激を行った。刺激により分泌が誘発され初期 30 秒にピークをもつ初期相とその後緩やかに分泌速度が上昇し 5 分で分泌持続期に入る持続相に分かれた。
- 2) 薬物を灌流系より 5 分間洗い流し、漢方薬単独を加えたが 1 種類 (甘草) のみ CCh 刺激がなくても分泌反応を起こした。他の 14 種類の漢方薬は、単独使用では唾液分泌を誘発しなかった。
- 3) 漢方薬添加後 5 分でこれにカルバコールを重畳すると、20 種類の漢方薬のうち 15 種類で唾液分泌の増強が観察された。いずれも初期相には影響がなく、分泌持続相の分泌速度を増強させた。増強効果のない 5 種の薬物がヒトで分泌増加を起こすのは神経活動あるいは内分泌活動の変化によるものと推定された。唾液腺に直接作用をもたらした 15 種の薬物に対する反応は 3 つのパターンに分けることができた。(I) 持続期全般を緩やかに増強する (プラトー値が高い) (図 1)。(II) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後緩やかに減少する (図 2)。(III) 持続期にはいり継続して分泌が増加し 5-10 分で最大値になった後急速に低下し、対照刺激のプラトー値より低レベルで分泌が持続する増強と抑制の二相性パターン (図 3)。I のパターンは養陰剤に、II のパターンは (補気剤、清熱剤、化痰剤 (日本漢方では祛痰剤)、3 種混合) に、III のパターンは活血剤に、それぞれ漢方薬分類の対応した (表)。

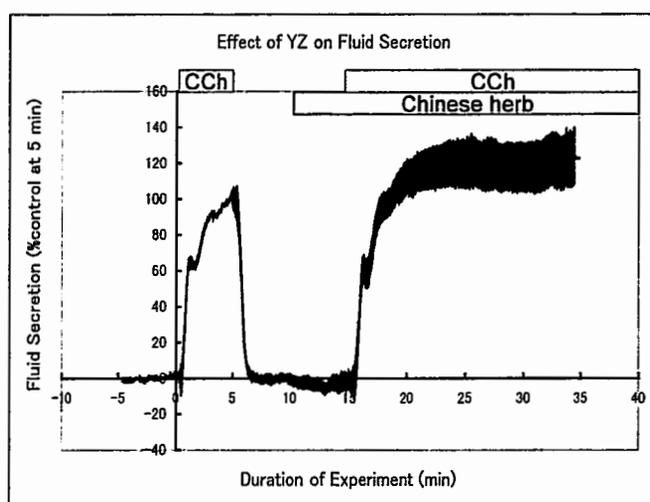


図 1 分泌増強パターン I

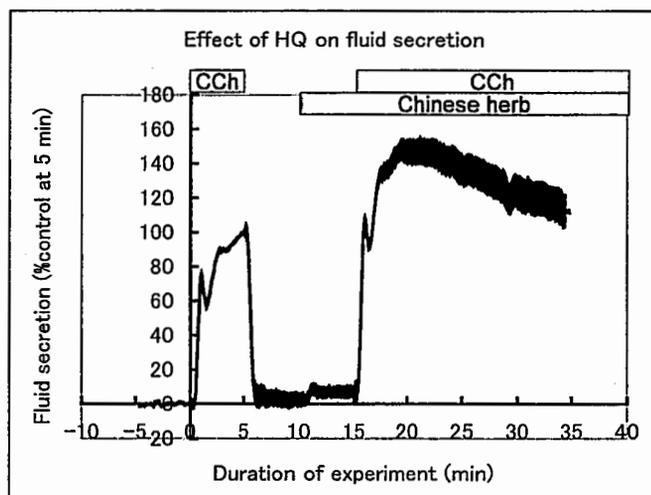


図 2 分泌増強パターン II

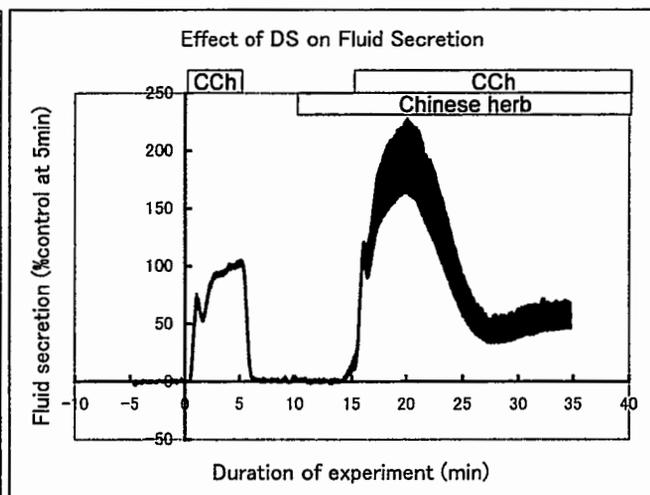


図 3 分泌増強パターン III

考察：

唾液分泌促進作用を有する漢方薬には唾液腺に直接作用し唾液分泌の持続相を増強する薬物が 15 種類存在し、漢方の薬効機序に対応する作用パターンが存在した (表)。これまで、西洋医学的手法により、細胞生理学的反応を臓器レベルに外挿してすべてを理解しようとしていたが、今回観察された分泌増強パ

ターンが生じる機構を少なくとも、1) 細胞内信号系への漢方薬の修飾効果、2) 傍細胞輸送系の開閉の調節機構、3) 臓器循環系の漢方薬による調節 の 3 つの視点から詳細な実験を進めてゆく必要がある。一方、唾液腺臓器レベルでは効果の見られなかった漢方薬は、おそらく個体(全身)レベルで神経系/内分泌系に作用し、唾液分泌を増強しているものと予測される。これらの薬物の効果については全身症状の変化を別個に考察することにより、機序の理解を進める可能性がある。今後 西洋医学的手法と中国医学の経験を結びつけ 蛋白分泌に対する漢方薬の影響や細胞内信号伝達に及ぼす影響などを調べることにより唾液分泌機序の新しい視点が生まれる可能性は極めて高い。また、単一細胞の生理学実験で得られない組織/器官系の反応パターンが漢方薬の分類と一致したことは、漢方分類が組織生理学研究に大きな示唆を与えることを示しており、逆に漢方分類の現代生理学的な理解に繋がることは疑いない。

表 漢方薬の分類と唾液分泌増強の反応パターン (I, II, III は前掲のグラフに対応する。)

漢方薬分類	漢方薬名	単独唾液分泌誘発	刺激唾液分泌増強	増強反応の型式
養陰剤	玉竹 (YZ)	なし	あり	プラトー持続増強 (I)
	麦門冬 (MD)	なし	あり	プラトー持続増強 (I)
	天門冬 (TD)	なし	あり	プラトー持続増強 (I)
	烏梅 (WM)	なし	あり	プラトー持続増強 (I)
補気剤	黄芩 (HQ)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
	太子参 (TZS)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
	甘草 (GC)	あり	あり	増強後緩除低下 (II)
清熱剤	天花粉 (THF)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
	赤芍 (CS)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
化痰剤 (祛痰剤)	皂角刺 (ZJC)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
	紫苑 (ZY)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
補気+養陰 +活血剤	丹地琼玉 (DDQY)	なし	あり	増強後緩除低下 (II)
活血剤	丹参 (DS)	なし	あり	二相性 (III)
	桃仁 (TR)	なし	あり	二相性 (III)
	穿山甲 (CSJ)	なし	あり	二相性 (III)
分泌に効果がないか減少させた漢方薬				
養陰剤	石斛 (SH)	なし	なし	なし
清熱剤	玄参 (XS)	なし	なし	なし
解表剤	葛根 (GG)	なし	なし	なし
養陰剤	沙参 (SS)	なし	なし	なし
清熱剤	生地黄 (DH)	なし	なし	なし

参考文献 :

1. Segawa A, Yamashina S, Murakami M (2002) Visualization of 'water secretion' by confocal microscopy in rat salivary glands: possible distinction of para- and transcellular pathway. Eur J Morphology 40: 241-246.
2. Murakami M, Murdiastuti K, Hosoi K, Hill AE (2006) AQP and the control of fluid transport in a salivary gland. J Membrane Biol 210: 91-103.
3. Murakami M, Novak I, Young JA (1986) Choline evokes fluid secretion by perfused rat mandibular gland without desensitization. Am J Physiol 251: G84-G89
4. Murakami M, Miyamoto S, Imai Y (1990) Oxygen consumption for K⁺ uptake during post-stimulatory activation of Na⁺,K⁺-ATPase in perfused rat mandibular gland. J Physiol 426: 127-143.
5. Murakami M, Seo Y, Watari H (1988) Dissociation of fluid secretion and energy supply in rat mandibular gland by high dose of Ach. Am J Physiol 254: G781-G787.

注：本研究の一部は、第 50 回および第 51 回日本唾液腺学会にて口演発表および特別講演、「日本唾液腺学会誌」46 巻 8-9, 2005 および「日本唾液腺学会誌」46 巻 3-5, 2006 に掲載された。また第 3 回ニールステンセン記念国際唾液腺シンポジウム (岡崎 2006 10 月、要旨集 p34) にてポスター発表された。唾液腺に関するゴードン会議 (Ventura, USA, 2007 2 月) にてポスター発表、および第 84 回日本生理学会大会 (大阪 2007 3 月) にて口演発表の予定である。

作成日：2007 年 1 月 31 日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

19年 3月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 大塚 吉兵衛 
所属機関名： 日本大学
所属部署： 歯学部 職名： 教授
〒 101-8310
所在地： 東京都千代田区神田駿河台1-8-13
電話： 03-3219-8010 内線： _____

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

南京市地域における口腔生活習慣病の実態調査－特に唾液検査を用いた疾患調査－

3. 成果の概要（100字程度）

日本と中国で、将来口腔衛生指導を担う学生について、歯周病罹患状態、口腔衛生および生活習慣の調査を行なった。中国の歯周病罹患率は日本の約3.2倍、歯磨時間は1/3であった。両国の協力の基に、口腔衛生教育のさらなる強化と改善案が求められる結果であった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 小宮山一雄 職名： 教授

所属機関： 日本大学 部署： 歯学部

中国側研究者氏名： 朱 玲 職名： 助教授

所属機関： 南京医科大学 部署： 口腔医学院

中国南京市地域における生活習慣に関する口腔疾患の実態調査
- 特に唾液検査を用いた疾患調査 -

研究代表者	教授 大塚 吉兵衛 (日本) 教授 王 林 (中国)
所属機関	日本大学歯学部 (日本) 南京医科大学口腔医学院 (中国)
共同研究者名	小宮山一雄 (日本) 朱 玲 (中国)

要 旨

日本と中国において、将来、口腔衛生の指導的立場を担う歯科医学生を対象として、生活習慣に起因する口腔疾患罹患状態について調査をおこなった。対象は日本大学歯学部学生 118 名と南京医科大学口腔医学院学生 92 名について、歯周病罹患状態を唾液潜血検査で、口腔衛生を含めた生活習慣を質問表による調査をおこない両者間で比較し検討をした。

調査の結果、唾液潜血試験陽性率（歯周病罹患率）は、日本の歯科学生（以下日本学生）が 13.6%、中国の歯科学生（以下中国学生）が 43.5%で、中国学生は若年者であるにもかかわらず高い歯周病罹患率を示した。また、質問調査の結果から以下の点が主に明らかとなった。全身疾患既往歴を持つ者は、日本学生が 10.2%であったのに対し、中国学生が 34.8%と高い割合を示し、そのなかに感染症が %含まれていた。歯科治療経験者は、日本学生の 88.1%に対し中国学生 51.1%と、中国では歯科受診の機会自体が少ないことが考えられた。さらに、歯肉の状態について出血があると答えた者は、日本学生は 7.6%であったが、中国学生は 37.0%と高い割合を示し、歯周病罹患率の高さを裏付ける結果となった。口腔清掃習慣に関しては、一日あたりの歯磨き時間の平均が、日本学生は 13.5 分で、中国学生は 4.6 分と短かった。また歯間清掃用具の使用について日本学生は 33.1%、中国学生は 7.6%であった。

以上の結果から、日本学生と中国学生における歯周病罹患率の差は、両者において口腔衛生に対する意識の差がみられることによると考えられた。口腔衛生に関する IQ が高いと考えられる歯科医学生間で大きな差がみられることは、南京市における口腔衛生施策を策定するうえで示唆を与える結果と思われる。施策の第一歩として、国民口腔衛生の指導を担う歯科学生に対して、歯周病の予防に歯磨きが有効であることを始めとした、口腔衛生全般に関する教育の強化が必要であると考えられた。

Key words 唾液潜血試験, 歯周病, 口腔衛生, 質問表

緒 言:

中国は近年、急速な近代化により、目覚ましい発展を遂げている。しかしながら、ジニ係数で比較すると、中国は日本と較べて 0.15 程度高い 0.45 と、社会の不安定要素を含んだ貧富の差が激しい国である。また、医療衛生の面からみると、1949 年の平均寿命 35 歳から 2000 年には 71 歳と、格段の伸びが見られている¹⁾。にもかかわらず、単位人口当たりの歯科医師数は日本の約 1/30 と極めて不足しており²⁾、12 歳の時点で歯周病罹患率が 69%であるなど、歯科疾患の罹患率は高いが専門家が少ないという矛盾した状況にある³⁾。1986 年の北京大学口腔医学院における調査では、抜歯原因の 44% (第 1 位) が歯周病で、重大な歯周病問題に直面しているにもかかわらず、歯周病治療を行う歯科医師が稀有であるという、中国の人々にとって不幸な状況が続いている⁴⁾。このような状況を打開し、効果的な歯周病予防プログラムを作成・実行するには、その背景にある

人々の生活習慣や口腔衛生に対する意識を調査し、それらの要素が歯周病の罹患状況とどのようにかかわっているか総合的に分析する必要があると考えられた。幸いなことに、南京医科大学口腔医学院の理解を得ることができ、唾液検査と質問表調査に関する共同研究を開始するための基礎が固まった。本共同研究はその第一段階として、唾液潜血検査による歯周病罹患状態および質問表により口腔衛生を含めた生活習慣を調査し、日本大学歯学部学生と南京医科大学口腔医学院学生とを比較し、その問題点の抽出を試みるとともに、改善策について考察を加えた。

対象と方法：

対象：調査の対象は、日本大学歯学部学生ボランティア（以下日本学生）122名ならびに南京医科大学口腔医学院学生ボランティア（以下中国学生）110名である。なお、日本における本研究調査は、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得ており、各学生ボランティアには研究の意味を書面ならびに口頭で説明し、書面による同意を得ている。また、中国学生の同意承諾については、南京医科大学口腔医学院王院長のもとに、倫理委員会の承認を得ている。

唾液潜血試験³⁵⁾：各被験者に3mlの水を含ませ、10秒間含漱後、紙コップに吐出させサンプルとした。サンプル液に抗体法唾液潜血試験紙（商品名：ペリオスクリーン「サンスター」、以下ペリオスクリーン）の下端を浸し、5分間液の上昇を待った後、結果の判定を行った。陽性（++，+）または陰性（±，-）の判定はメーカーのマニュアルに従い、日本大学歯学部と南京医科大学口腔医学院それぞれにおいて担当する歯科医師が行った。

質問表：被験者に対する生活習慣ならびに口腔衛生習慣を問う質問表は、日本大学歯学部附属歯科病院歯周病科で用いられているものを、伊藤公一教授の供与を受けて使用した。質問項目は、年齢、性別、既往歴、歯科治療経験、口腔に関する自覚症状や習癖、食事や嗜好品、口腔清掃習慣など多岐に亘っており、記入に要する時間は5分程度の質問内容であった。

質問表の結果と唾液潜血試験結果との関係：質問表の集計結果とは別に、質問表のいくつかの質問項目とペリオスクリーンの判定結果との間に有意な関係があるかどうかを、 χ^2 検定を用いて調べた。

唾液中の肝細胞増殖因子の定量：唾液中の肝細胞増殖因子（HGF）量と歯周疾患の進行度とが有意に相関するという報告が日本⁶⁾とポーランド⁷⁾でなされてきたことから、中国においてもHGFが歯周病の疾患マーカー候補となりうるかどうかを調べた。南京医科大学口腔医学院の学生ボランティアから全唾液の採取を行い、凍結保存したものを日本大学歯学部へ搬送した。この全唾液をサンプルとして、市販のELISA kit (R&D Systems) を用いてHGFの定量を行い、ペリオスクリーンの判定結果（++，+，-）とHGFの定量結果との相関を調べた。

結果：

日本大学歯学部学生ボランティアによる質問表の有効回答数は118名で平均年齢は22.9歳、南京医科大学口腔医学院学生ボランティアの質問表有効回答数は92名で平均年齢は22.1歳であった。

ペリオスクリーンによる唾液潜血検査の結果を表1に示した。両者の陽性率を比較すると、日本学生は13.6%で、中国学生は43.5%であり、若年者集団としては非常に高い陽性率を示した。

表1に示した質問表の結果から、日本学生と中国学生の主な相違点を抜粋すると、全身疾患既往歴を持つ者は、日本学生が10.2%であったが、中国学生は34.8%と高率を示し、かつ肺炎、肝炎などの感染症が含まれていた。歯科治療経験者は、日本学生は88.1%であったが、中国学生は51.1%と、中国学生の歯科治療経験は日本学生の半数であった。なかでも矯正治療経験者は、日本学生の18.6%に比べ、中国学生4.4%と大きな差がみられた。口腔内の状態に関する質問項目のうち、歯肉の状態を問うものでは、歯肉出血があると答えた者は、日本学生は7.6%であったが、中国学生は37.0%と高率を示した。歯肉に痛みを感じない者は日本学生1.7%、中国学生12.0%で、膿が出ると答えた者が、中国学生には3.3%存在した。また、中国学生には、硬いものが嚥

めないという者が 2.2%存在した。歯周病のリスクファクターとされる喫煙率は、日本学生 27.1%、中国学生 2.2%と、日本の方がはるかに高かった。歯軋り・くいしばりは、日本学生は 21.2%、中国学生は 13.0%と、日本の方が高い値を示した。口腔清掃習慣に関しては、一日あたりの歯磨き時間の平均が、日本学生は 13.5 分であったが、中国学生は 4.6 分と短かった。歯間清掃用具の使用が日本学生では 33.1%、中国学生では 7.6%と少なかった。

ペリオスクリーン陽性者と質問表各項目との関連を χ^2 検定によって調べたところ、中国学生において、歯肉の痛み、歯肉の腫れ、歯肉出血との間に危険率 5%未満で有意な関連が認められ、それぞれのオッズ比は、歯肉の痛み 7.2、歯肉の腫れ 3.8、歯肉出血 2.7 であった。日本学生においては、ペリオスクリーン陽性者が少なかったためか、いずれの項目に関しても有意な関連は認められなかった。

中国学生から採取した全唾液を試料として、HGF の定量を行った結果を図 1 に示した。ペリオスクリーンの判定結果が- から+、++と高くなるのに従い、全唾液中の HGF 量は増加傾向を示し、相関係数は 0.347 と有意な相関を示した。

考 察：

日本と中国との間で、生活習慣の差に基づく口腔疾患罹患状況を知るための最初のステップとして、唾液検査と質問表調査を併用した共同研究を行った。今回の研究は、日本でも高い罹患率であることが知られている歯周病に焦点を当て、ペリオスクリーンを用いた唾液潜血検査と歯周病に関連した質問表調査を、日中両国の歯科学生を対象として行った。

ペリオスクリーン「サンスター」は、日本大学と合同酒精が共同開発した唾液や洗口液中のヘモグロビンを抗体によって検出する試験紙で、感度、特異度とも約 90%という優れた歯周病スクリーニングのための試験紙である^{3,5)}。本研究では、個別の歯周病検診が行えなかったため、便宜的にペリオスクリーン陽性者を歯肉炎または歯周炎などの歯周病有病者とした。このペリオスクリーンを用いて唾液潜血試験を行った結果、日本学生と比較して中国学生は 43.5%という高い陽性率を示した。この陽性率は、日本人を対象とした研究⁴⁾における 35-40 歳の中間値に相当し、しかも対象が歯科学生であることを併せて考えると、中国における歯周病への罹患は日本と較べて低年齢で始まっていることが予想された。実際、1995 年に中国で実施された口腔疫学調査⁷⁾では、12 歳における歯周病罹患率は 69%、15 歳が 78.4%、18 歳で 85.2%であったと報告されている。今後は、学生ばかりでなく小児を含めた全年齢層での検査が必要であると思われる。

質問表による調査結果では、中国学生の全身疾患既往歴を有する者の割合が高く、しかも感染症の既往が数名あったことから、口腔衛生の啓蒙とともに、公衆衛生レベルを高めていく必要性が示唆された。

歯科治療経験を問う項目では、中国学生の約半数が歯科治療未経験であることが判明した。しかしながら、中国における対人口歯科医師数は日本の約 1/30 であるという報告⁸⁾を考え併せると、中国学生の受診率は一般人に較べて高い可能性がある。いずれにしても、歯科受診の機会に恵まれている状況ではないことが判明した。歯科医院で刷牙指導を受ける機会の少なさが、歯周病罹患の低年齢化と関連する原因の一つとして考えられた。

口腔内の状態に関しては、歯肉の痛み、歯肉の腫れ、歯肉出血などの歯肉の症状を訴えている者の割合が中国学生で高かった。 χ^2 検定の結果からも、歯肉の症状は歯周病有病者である可能性が高く、上記の 3 症状のいずれかが現れたら、すぐに歯周病科を受診できる機会をつくる必要性があると考えられた。この歯周病罹患率の高さにもかかわらず、南京医科大学口腔医学院での現地調査で、口腔インプラント科には多くの来院患者を認めたことは対照的に、歯周病科には少数の患者しか認めず歯科臨床現場においても、南京市地域住民の口腔健康意識の偏りを確認できた。この点については、中国における社会保障制度など歯科医療を取り巻く環境との関連とあわせ検討をすすめる必要性があると考えられる。

口腔清掃習慣に関しては、まず日本学生と中国学生との間では、一日の平均歯磨き時間に約 3 倍の開きがあることが明らかとなった。今回の質問表には、中国学生がこれまでにどこでどのような歯磨き指導を受けてきたのかを問う項目がなかったため、この差が何に起因するのかは明らかにできなかった。しかしながら、南京

医科大学口腔医学院入学者の知識レベルが一般人より相当高いことを考慮すると、中国においては「歯磨きの重要性」を認識する機会自体が、極めて少ないことが考えられた。さらに、中国では歯科衛生士制度ならびにその教育機関が存在しないことも、「歯磨きの重要性」を人々が認識する機会が少ないことと関係していると考えられた。

唾液中の歯周病罹患マーカー候補タンパクである HGF を、中国学生からの全唾液サンプルを用いて定量し、ペリオスクリーンの判定結果との相関を調べた。その結果、HGF 量はペリオスクリーンの判定が陰性の- から陽性の+, ++と向かうほど高値をしめす傾向がみられ、有意な相関を確認した。これは、日本人とポーランド人を対象にそれぞれ行われた研究^{6,7)}と同様の結果であり、中国人の集団においても HGF が歯周病のマーカー候補タンパクとなりうることを示された。今後は、この貴重なサンプルを活用し、他の歯周病罹患マーカー候補タンパクについても解析を継続して行い、唾液を用いた歯周病検査の精度を向上させていきたい。

以上の調査結果から、将来中国の口腔衛生に関する指導的立場を担う中国学生に対して、う蝕や歯周病の予防における「歯磨きの重要性」を再認識させ、さらには口腔衛生全般に関する教育の強化を通じて、公衆衛生の向上を目指した啓発運動が必要である。これは、絶対的に不足した歯科医師数で歯科疾患の罹患率を 10 年後、20 年後に減少させるためには、予防の徹底が必要不可欠であるという教育が、最も費用対効果が高いことを示すべきであると思われる。そのためには、かつての日本がそうであったように、歳を取って歯が抜けるのは、「自然現象ではなく病気」なのだという認識を国民全体に広めるキャンペーン活動が有効であると考えられる。

本調査研究が、日中両国の学生による「ペリオスクリーン陽性率 0%」を目指した口腔衛生習慣づくりのための動機付けの一助となることを期待する。

謝 辞：

本共同研究は、日中医学協会の 2006 年度研究助成事業の援助を受けて行われた。また、調査に協力いただいた日本および中国の学生諸君、中国側現地スタッフに感謝いたします。さらにペリオスクリーン「サンスター」ならびに歯ブラシを提供して下さったサンスター株式会社に、深く感謝の意を表します。

参考文献：

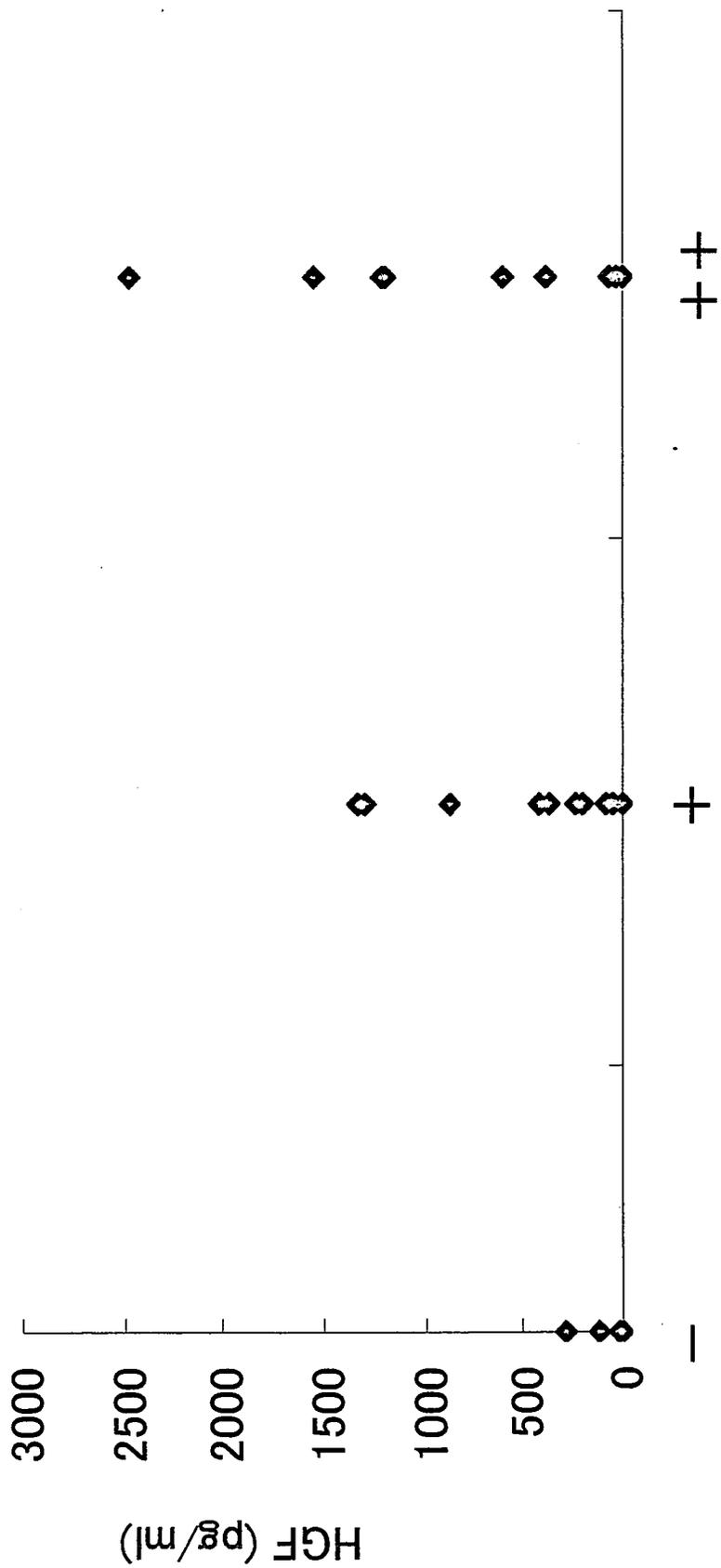
1. 曹采方：中国における歯周病学の現状，日中医 vol 17, 26-33 (2003).
2. 長谷川紘司，曹采方：中国人の歯周病罹患状況調査と中国人歯科医師への歯周治療学教育，日中医学 vol 19, 37 (2004)
3. 大島光宏，鈴木邦治，江田昌弘，佐藤慶伴，伊藤公一，村井正大，大塚吉兵衛：唾液潜血試験におけるモノクローナル抗体を用いたヘモグロビン検出試験紙の有用性，日歯周誌 vol 39, 273-280 (1997)
4. 大島光宏，藤川謙次，有泉実，沈在明，鈴木邦治，吉沼直人，江田昌弘，伊藤公一，村井正大，大塚吉兵衛：モノクローナル抗体を用いた唾液潜血試験紙の歯周疾患スクリーニングテストにおける有用性—臨床パラメーターとの関連性について—，日歯周誌 vol 40, 111-118 (1998)
5. 大島光宏，藤川謙次，熊谷京一，出澤政隆，江澤真恵，伊藤公一，大塚吉兵衛：新しい唾液潜血試験紙法による歯周疾患のスクリーニングテストの有用性，日歯周誌 vol 43, 416-423 (2001)
6. Mitsuhiro Ohshima, Kenji Fujikawa, Hideyasu Akutagawa, Takashi Kato, Koichi Ito, Kichibee Otsuka (2002) Hepatocyte growth factor in saliva: a possible marker for periodontal disease status. J Oral Sci, 44, 35-39
7. Magdalena Wilczynska-Borawska, Jacek Borawski, Oksana Kovalchuk, Lech Chyczewski and Wanda Stokowska: Hepatocyte growth factor in saliva is a potential marker of symptomatic periodontal disease, J Oral Sci vol 48, 47-50 (2006)

表1 ペリオスクリーニングの判定とアンケート調査結果

	既往歯科治療理由									
	虫歯	抜歯	矯正	歯肉	冠入れ歯	歯科治療経験	健康状態(良好)	頭痛、顎関節の痛み	アレルギ	全身既往歴
日本	97	61	22	4	21	104	99	6	12	16
(%)	82.2	51.7	18.6	3.4	17.8	88.1	83.9	5.8	10.2	13.6
中国	32	26	4	5	2	47	88	12	32	40
(%)	34.8	28.3	4.3	5.4	2.2	51.1	95.7	13.0	34.8	43.5

	現在の歯と口腔の状態					口腔の習癖				
	歯が動く	硬いものが噛めない	歯間に食べ物が挟まる	水・湯が歯にしみる	歯・頬・舌・唇を噛む	口呼吸	爪・鉛筆などを噛む癖	口の中が粘つく	口臭がある	歯が動く
日本	2	0	29	10	11	11	5	9	2	0
(%)	1.69	0.00	24.58	8.47	9.32	9.32	4.24	7.63	1.69	0.00
中国	4	2	37	10	5	10	3	0	4	2
(%)	4.3	2.2	40.2	10.9	5.4	10.9	3.3	0.0	4.3	2.2

	口腔清掃習慣									
	嗜好品・生活習慣	平均歯磨き時間(分/日)	ナイロン歯ブラシの使用	歯肉マッサージ	歯間清掃用具の使用	爪楊枝の使用	口腔洗浄器の使用	洗口液の使用	喫煙	飲酒
日本	35	13.5	98	26	39	18	2	14	29.66	27.12
(%)	29.66	94.07	87.29	22.03	33.05	15.25	1.69	11.86	61.02	27.12
中国	0	4.6	91	0	7	10	0	1	59	2
(%)	0.0	98.9	98.9	0.0	7.6	10.9	0.0	1.1	64.1	2.2



パリオスクリーニングの判定結果

図1 パリオスクリーニングの判定結果と唾液中HGF濃度との関係

$r = 0.347$

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成19年 3月12日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 唐子 堯 
所属機関名： 東京大学医学部附属病院
所属部署： 肝胆膵外科 職名： 助手
〒 113-8655
所在地： 東京都文京区本郷7-3-1
電話： 03-5800-8654 内線：

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

肝細胞がん肝内転移抑制剤候補化合物としての新規ピロリジン誘導体の評価

3. 成果の概要 (100字程度)

肝細胞がんの治療において外科的切除は有効的な方法であるが、術後の再発率は6割を超えており、血管侵襲や周囲への増殖などの肝内進展がその最大の原因と考えられている。本研究は、肝がんの肝内転移を抑制する新規ピロリジン誘導体に着目し、肝がんの肝内転移を抑制する化学療法剤の開発を目指して一連の研究を行った。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 唐子 堯 (Wei TANG) 職名： 助手

所属機関： 東京大学医学部附属病院 部署： 肝胆膵外科

中国側研究者氏名： 曲 顕俊 職名： 教授・所長

所属機関： 山東大学薬学院 部署： 新薬薬理研究所

肝細胞がん肝内転移抑制剤候補化合物としての新規ピロリジン誘導体の評価
—Novel Pyrrolidine Derivatives as Candidates for Inhibitors against Intrahepatic Metastasis of
Hepatocellular Carcinoma

研究代表者名：唐子 堯

日本研究機関名：東京大学医学部附属病院

中国側共同研究代表者名：曲 顕俊

中国所属機関名：山東大学薬学院

中国側共同研究者名：陈 明慧 (山大・薬), 程 艳娜 (山大・薬), 许 焕丽, 徐 文方 (山大・薬)

日本側共同研究者名：稲垣 善則 (東海大・工), 中田 宗宏 (東海大・工), 幕内 雅敏 (東大・医)

Abstract. LY52 is a caffeoyl pyrrolidine derivative designed to fit S₁ active pocket of gelatinases that act in tumor invasion and metastasis. Here we examined the effect of LY52 on angiogenesis and the subsequent invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma (HCC). Anti-metastasis ability of LY52 was first evaluated in the pulmonary metastasis of B16F10 murine melanoma cells in C57/BL6 mice. Growth inhibition of LY52 on tumor cells was assayed in the human HCC SMMC-7721 tumor xenografts in nude mice. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial cell marker CD34 expression were also evaluated immunohistochemically in the SMMC-7721 tumor xenografts in nude mice. Tumor microvessel density (MVD) was quantified according to immunohistochemical staining for CD34 in tumor xenografts. Furthermore, effect of LY52 on angiogenesis *in vitro* was tested in the chicken chorioallantoic membrane (CAM) model. LY52 showed an inhibitory effect on pulmonary metastasis of B16F10 murine melanoma cells in C57/BL6 mice without significant toxic effects. The growth of SMMC-7721 cells in nude mice was significantly inhibited after treatment with LY52 for 4 continuous weeks. Immunohistochemical study showed that VEGF and CD34 expression in the tumor xenografts were suppressed in the presence of LY52. Accordingly, MVD was significantly decreased in the LY52-treated group compared with the control group. A dose-dependent inhibition on angiogenesis was demonstrated in the chicken CAM after incubation with LY52 for 72 hour. Thus, LY52, a caffeoyl pyrrolidine derivative, would be a lead compound to suppress intrahepatic invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via inhibiting proteolytic activities of MMP-2 and MMP-9.

Key words: Caffeoyl pyrrolidine derivative, LY52, human hepatocellular carcinoma, invasion, metastasis, SMMC-7721 cell line, angiogenesis, matrix metalloproteinase

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common forms of malignant cancer, especially in Asian countries. Recent progress in the diagnosis and treatment modalities has improved the prognosis of patients with HCC. However, the long-term prognosis remains disappointing because of the frequent recurrence and the development of intrahepatic metastasis of HCCs in 16%-65% of patients. The intrahepatic metastasis is mostly caused by the portal vein invasion (PVI) of HCC, which eventually results in the spread of cancer cells into the liver. PVI, the first and the key step of intrahepatic metastasis of HCCs, is initiated by extracellular matrix (ECM) degradation and determines the prognosis of patients with HCCs. As HCC is a highly vascular tumor, the

progression of HCC is greatly related to active neovascularization, which helps in the nutrient and oxygen supply. Angiogenesis, the process of forming new blood vessels from existing ones, requires degradation of the vascular basement membrane and remodeling of the ECM in order to allow endothelial cells to migrate and invade into the surrounding tissue. Thus, degradation of basement membranes and ECM might closely correlate with angiogenesis and intrahepatic metastasis of HCCs.

Gelatinases, including matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, play an important role in degradation of basement membrane collagen type IV, which is associated with tumor invasion and metastasis. Active MMP-2 and MMP-9 were proven to be the major enzymes responsible for the high gelatinolytic activity at the invasive front of HCCs. Therefore, regulation of MMP-2 and MMP-9 is important in the development of novel therapeutic strategies against angiogenesis and intrahepatic metastasis of HCCs.

Three-dimensional structure analysis of MMP molecules showed that the S'1 active pocket in MMP-2 and MMP-9 is deeper than that of the other type of MMPs such as MMP-3. This has provided helpful clues when using structure-based design strategies to discover novel MMP inhibitors that selectively block the activity of MMP-2 and MMP-9. We have previously reported that some caffeoyl pyrrolidine derivatives, which were designed based on a lead MMP inhibitor CGS27023A, were potential gelatinase inhibitors and suggested that LY52, one of these caffeoyl pyrrolidine derivatives, might suppress tumor invasion and metastasis via selectively blocking proteolytic activities of MMP-2 and MMP-9. But the effect of LY52 on tumor angiogenesis has not been studied. In the present study, we examined the effect of LY52 on angiogenesis and growth and metastasis of human HCC SMMC-7721 cells.

Materials

Reagents. Caffeoyl pyrrolidine derivative LY52 (Fig. 1), white power, insoluble in water, was designed and synthesized as described previously. The compound was dissolved in dimethylsulfoxide for in vitro assay and in 5% amyllum for in vivo study. Monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF), monoclonal antibody against CD34 and peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). White chicken eggs were provided by Institute of Animal Sciences, Shandong Academy of Agricultural Sciences (Jinan, China).

Cells and animals. Human HCC SMMC-7721 cell line, which simultaneously expresses both MMP-2 and MMP-9, was provided by Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences (Shanghai, China). B16F10 murine melanoma cell line was purchased from the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences (Beijing, China). Female C57/BL6 mice, 5-6 weeks of age, and female Balb/c athymic (nu+/nu+) mice, 19-22 g, were purchased from the Institute of Experimental Animal, Chinese Academy of Medical Science.

Results

Inhibition of pulmonary metastasis of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice.

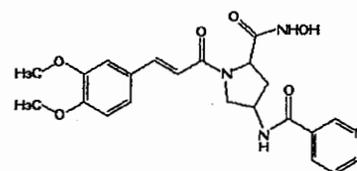


Fig.1 Chemical structure of LY52.

Anti-metastasis ability of LY52 was evaluated in the pulmonary metastasis model of B16F10 murine melanoma cells in C57/BL6 mice. As shown in **Table 1**, LY52 significantly reduced the number of pulmonary metastatic nodules of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice after continuous treatment for 3 weeks.

Inhibition of the growth of SMMC-7721 cells in nude mice. The nude mice inoculated with SMMC-7721 cells were treated with LY52 for 4 continuous weeks. Tumor weights of each group were shown in **Table 2**. The inhibition rates by 50 and 100 mg/kg of LY52 were 23.6 and 34.1%, respectively.

Inhibition of VEGF expression in SMMC-7721 tumor xenografts. VEGF expression in SMMC-7721 tumor xenografts was immunohistochemically examined. As shown in **Fig. 2A** the inhibition rates by 25 and 100 mg/kg of LY52 were 32.3 and 52.3%, respectively.

Inhibition of MVD-CD34 in SMMC-7721 tumor xenografts. Tumor MVD was evaluated by immunostaining for CD34 expression in SMMC-7721 tumor xenografts. LY52 significantly inhibited the CD34 expression in SMMC-7721 tumor xenografts in nude mice. As shown in **Fig. 2B** at the doses of 0, 50 and 100 mg/kg of LY52, CD34 expression rates were 42.1±6.1, 34.9±2.8* and 28.5±3.1*, respectively (*p<0.05 vs control).

Inhibition of angiogenesis in chicken CAM. As shown in **Fig. 3A**, dramatic vasculature with intact structure was visible in the CAMs of the control group. LY52 significantly inhibited the angiogenesis in the CAMs after incubating for 72 hours. In the doses of 1 and 10 µg/0.5cm², LY52 slightly inhibited the blood-vessels growth and branching (**Fig. 3B** and **3C**, p>0.05). In the dose of 100 µg/0.5cm², vasculature density was significantly reduced and vessel structure disordered with the main vessel branches intervening, tortuous and attenuated (**Fig. 3D**). At the doses of 1, 10 and 100µg/0.5cm² of LY52, VI was 92.8±1.9, 74.2±2.1 and 59.1±1.3% (p<0.05), respectively.

Discussion

HCC cells possessed gelatinolytic activity, which was significantly and closely associated with cancer invasion to the capsule and also to the portal veins. Gelatinases especially MMP-2 and MMP-9 play an important role in regulating processes of tumor angiogenesis, invasion and metastasis. LY52 has an inhibitory effect on the proteolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in carcinoma cells. Thus, the present study focused on effects of LY52 on angiogenesis, growth and metastasis of HCCs. First,

Table 1. Effect of LY52 on pulmonary metastasis of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice.

Dosage (mg/kg)	Mice (n)	Mice weight (g)	Lung weight (g)	Foc/lung (n)	Inhibition (%)
0	10	22.5±2.8	0.13±0.03	88.6±11.7	-
25	9	23.1±3.1	0.12±0.01	65.0±12.3*	24.4
50	10	21.7±2.1	0.12±0.01	49.1±11.3*	43.5
100	10	21.3±3.6	0.12±0.02	35.3±10.2*	60.2
Carboxylates	7	18.2±4.1	0.13±0.02	68.6±14.4*	22.6

Table 2. Effect of LY 52 on the growth of SMMC-7721 tumor xenografts in nude mice.

Dosage (mg/kg)	Mice (n)	Mice weight (g)	Tumor weight (g)	Inhibition (%)
0	6	23.1±3.2	2.34±0.63	-
50	6	23.1±3.1	1.76±0.81*	23.6
100	6	21.7±2.1	1.45±0.96*	34.1
Carboxylates	6	23.2±4.1	1.53±1.12*	22.6

Carboxylates, 100 mg/kg. *p<0.05 vs control group

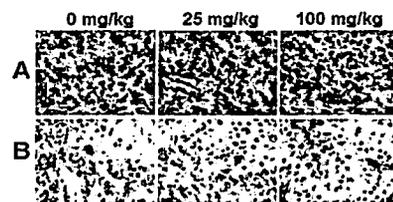


Fig. 2. Immunohistochemical staining of VEGF (Fig. 2A) in the SMMC-7721 tumor xenografts in nude mice and CD34 (Fig. 2B) in the vascular endothelial cells of the SMMC-7721 tumor xenografts (Original magnification: ×400) with LY52 treatment at 0, 25 mg/kg, and 100 mg/kg.

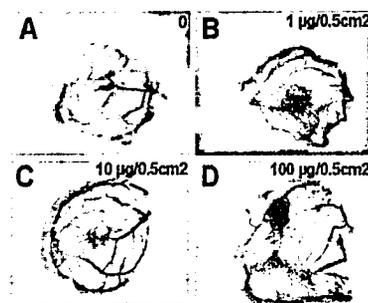


Fig. 3 Effect of LY52 on the angiogenesis in chicken CAMs. CAMs were exposed to 0.5 cm² of filter papers containing 10 µl of different doses of LY52. Eggs were sealed and incubated under constant humidity for 72 h incubation. CAMs were collected and the vessels were counted as described in the method.

examination for anti-metastatic ability of LY52 in vivo was performed with pulmonary metastatic model of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice. Oral administration of LY52 significantly prevented the pulmonary metastasis of B16F10 cells in mice devoid of toxic effects (Table 1). Then, Human HCC MMC-7721 cells, simultaneously express MMP-2 and MMP-9, were selected to inoculate to nude mice to form tumor xenografts, and the effect of LY52 on the growth and angiogenesis in tumor xenografts was examined. LY52 significantly inhibited the growth of MMC-7721 tumor xenografts (Table 2). The angiogenetic activity is reflected in the development of novel microvessels in tumor tissue that is quantified by the intratumoral MVD. Previous studies showed that high tumor MVD-CD34 was a significant predictor of tumor recurrence after resection of small HCCs < 5 cm. VEGF is one of the most extensively investigated angiogenetic factors. Increased expression of both VEGF and CD34 enhanced the adhesion of tumor cells to basement membrane and the release of MMP-2 and MMP-9. Thus, VEGF expression and MVD-CD34 were used as predictive factors of the response to anti-angiogenetic drugs in our study. Immunohistochemical studies showed that LY52 significantly inhibited VEGF expression and MVD-CD34 in SMMC-7721 tumor xenografts (Fig. 2). LY52 was also found to directly inhibit angiogenesis in the chicken CAM assay (Fig. 3). These results showed that LY52 inhibited angiogenesis both in vivo and in vitro, as well as growth and metastasis of HCCs.

LY52 was designed to specifically block the activity of MMP-2 and MMP-9. Thus, our studies suggested that LY52 might inhibit angiogenesis in invasion and metastasis of HCCs via blocking the proteolytic activities of MMP-2 and MMP-9. The metastasis of tumor cells is a multistep and extremely complex process in which many factors participate. LY52 can not be involved in the full process. However, our preliminary results suggested that LY52 might be a better candidate compound for anti-invasion and anti-metastasis of HCCs at present.

Parts of this study were presented as follows:

1. Qu X, Yuan Y, Tian Z, Xu W, Chen M, Cui S, Guo Q, Gai R, Makuuchi M, Nakata M, Tang W: Using caffeoyl pyrrolidine derivative LY52, a potential inhibitor of matrix metalloproteinase-2, to suppress tumor invasion and metastasis. *Int J Mol Med.* 2006; 18 (4), 609-614.
2. Qu X, Yuan Y, Xu W, Chen M, Cui S, Meng H, Li Y, Makuuchi M, Nakata M, Tang W: Caffeoyl pyrrolidine derivative LY52 inhibits tumor invasion and metastasis via suppression of matrix metalloproteinase activity. *Anticancer Res.* 2006; 26, 3573-3578.
3. Liu J, Xu WF, Cui SX, Zhou Y, Yuan YX, Chen MH, Wang RH, Gai RY, Makuuchi M, Tang W, Qu XJ. Inhibition of human gastric carcinoma cell growth by atofluding derivative N3-o-toluyyl-fluorouracil. *World J Gastroenterol.* 2006;12, 6766-6770.
4. Tang W, Yuan Y, Tian Z, Xu W, Chen M, Cui S, Guo Q, Gai R, Makuuchi M, Nakata M, Qu X: Inhibition of active matrix metalloproteinase-2 expression and tumor invasion and metastasis by caffeoyl pyrrolidine derivative LY52. *11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine, October 12-14, 2006, Crete, Greece.*

作成日：2007年3月12日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2007年 3月 13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 中西敏雄  (印)

所属機関名： 東京女子医科大学

所属部署： 国際統合医科学
インスティテュート 職名： 教授
〒 162-8666

所在地： 東京都新宿区河田町8-1

電話： 03-3353-8111 内線： 28482

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

動脈管収縮弛緩におけるガス状血管弛緩因子の役割

3. 成果の概要 (100字程度)

動脈管における膜電位依存性カリウムイオンチャンネル(Kv)の発現をRNAレベルと蛋白レベルで明らかにした。Kvは胎生がすすむと減少することがわかった。

Kv発現におけるガス状血管弛緩因子の関与は少ないことがわかった。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 中西敏雄 職名： 教授

所属機関： 東京女子医科大学 部署： 国際統合医科学インスティテュート

中国側研究者氏名： 杜 軍保 職名： 教授

所属機関： 北京大学 部署： 第一病院小児科

動脈管収縮弛緩におけるガス状血管弛緩因子の役割
—カリウムチャンネル発現への影響—

日本側研究者氏名	中西 敏雄	職名	教授
日本所属機関	東京女子医科大学 国際統合医科学インスティテュート		
中国側研究者	杜 軍保	職名	教授
中国研究機関	北京大学 第1病院小児科		

Abstract

Oxygen-sensitive, voltage-gated potassium channels (Kv) may contribute to the determination of the membrane potential in smooth muscle cells of the ductus arteriosus (DA) and, thus, to regulation of contractile tone in response to oxygen. Developmental changes in Kv during gestation may be related to dilation of the DA during fetal life and closure of the DA after birth. This study investigated developmental changes in the expression of Kv in the DA and compared it with that of the pulmonary artery (PA) and the aorta (Ao). The role of gasotransmitter NO on the expression of Kv was examined by administering a potent nitric oxide synthase inhibitor, Nomega-nitro-L-argininemethyl ester (L-NAME), to a pregnant rat at day 19, 20 and 21 of gestation. The DA, PA and Ao were isolated from fetal rats at days 19 and 21 of gestation (term; 21.5 days). The expression of Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 and Kv3.1, putative oxygen-sensitive Kv channels which open in response to oxygen, was evaluated at both the mRNA and protein levels, using quantitative real-time PCR and immunohistochemistry. In the Kv family studied, Kv1.5 mRNA was expressed most abundantly in the DA, PA and Ao in both day 19 and day 21 fetuses. Although the expression levels of Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1 did not change much with development in the PA and Ao, in the DA they decreased with development. L-NAME (10mg/kg) did not cause any changes in the expression of Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1 in the DA in day 20 and day 21 fetus. The role of NO in dilating DA during fetal life may be minimal in the near-term fetal rat. The decrease in the expression of Kv channels may enhance DA closure after birth by eliminating the opening of Kv channels when oxygen increases.

Key words: Ductus arteriosus; Development; Gene expression; Oxygen; Potassium channel. Gasotransmitter

Introduction:

The ductus arteriosus (DA), a vital artery connecting the pulmonary artery (PA) and aorta (Ao) which diverts blood from the PA to the descending Ao during the fetal period, constricts in response to the increase in oxygen (O₂) tension in the blood at birth. The responses of blood vessels to changes in O₂ tension vary depending on the location of the blood vessels and on the developmental stages. The isolated small PA relaxed in response to an increase in O₂ tension, whereas the isolated main PA showed no response or only a slight constriction after an acute increase in O₂ tension. The isolated Ao showed no response to an increase in O₂-tension. However, the DA isolated from the mature fetus constricted markedly in response to an increase in O₂ tension.

Potassium (K) channels play a major role in maintaining the resting membrane potential of vascular smooth muscle cells, thus regulating vascular tone. It is known that some voltage-dependent K-channels (Kv) in arteries are O₂-sensitive. The opening of Kv channels in vascular smooth muscle cells causes membrane hyperpolarization, inactivates voltage-gated Ca²⁺ channels, and decreases the intracellular Ca²⁺ concentration, leading to vasorelaxation.

Only a few studies have reported the expression of Kv channels in the DA and there is no report of a study comparing the expression of Kv channels among the Ao, PA, and DA with advancing gestation during fetal life. As the DA closes while the PA and Ao remain open after birth, there might be a difference in the expression of oxygen-sensitive Kv channels between the DA, PA and Ao. Therefore, our aim was to determine the expression of Kv channels in the DA, PA and Ao at different gestational stages at the mRNA and protein levels.

Nitric oxide is known to dilate vessels including DA. The role of gasotransmitter NO on the expression of Kv remains unknown. It may stimulate the expression of Kv, thus causing vasodilation during fetal life.

Materials and methods:

We used fetal rats at days 19 and 21 of gestation to examine the developmental expression of Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 and Kv3.1 in the DA, PA and Ao. Total RNAs of the DA, PA and Ao were isolated from pooled segments of 240 day 19 rat fetuses and 140 day 21 rat fetuses. The total RNA was reverse-transcribed into cDNA with random hexamers and MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Fostacity, CA, U.S.A). The real-time PCR reaction was conducted with a Premix Ex Taq Kit (Takara Bio) using an ABI PRISM™ 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). For each sample analyzed, cDNA copy numbers were calculated on the basis of the results of the standard curve of the same run. The Kv cDNA copy numbers were normalized using the calculated GAPDH cDNA copy number of the same sample.

Tissues of the DA, PA and Ao excised from both day 19 and day 21 fetal rats were fixed in 4% cold

paraformaldehyde for histoimmunochemistry. Rabbit polyclonal antibodies (anti-Kv1.2, anti-Kv1.5, anti-Kv2.1 and anti-Kv3.1) were used.

Results:

The expression of Kv1.2 mRNA in the DA was less than that in the PA and the Ao on both day 19 and day 21 (Fig. 1). In both the PA and Ao, expression of Kv1.2 mRNA in the day 19 fetuses was similar to that in the day 21 fetuses. In the DA, however, the expression of Kv1.2 mRNA in the DA of the day 21 fetuses was less than that in the day 19 fetuses. In the day 19 fetuses, the expression of Kv1.5 mRNA was approximately equivalent in the DA, PA and Ao. In the day 21 fetuses, the expression of Kv1.5 mRNA in the DA was less than that in the PA and Ao.

In both the day 19 and day 21 fetuses, the staining of Kv1.2 was light in the DA, moderate in the PA and intense in the Ao. In the DA, the staining intensity of Kv1.2 in the day 21 fetus was lighter than that in the day 19 fetus.

The role of gasotransmitter NO on the expression of Kv was examined by administering a potent nitric oxide synthase inhibitor, Nomega-nitro-L-argininemethyl ester (L-NAME), to a pregrant rat at day 19, 20 and 21 of gestation. L-NAME (10mg/kg) did not cause any changes in the expression of Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1 in the DA in day 20 and day 21 fetus.

Discussion:

In this study, we have demonstrated, for the first time, developmental changes in the expression of Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 and Kv3.1 in the DA, PA and Ao in rat fetuses at both mRNA and protein levels. Quantitative real-time PCR data showed a lower mRNA expression of Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 and Kv3.1 in the DA in day 21 fetuses than in day 19 fetuses, and these results corresponded well with the results of protein expression detected by immunohistochemistry. The decrease in the expression of Kv channels in the DA may reduce the opening effect of Kv channels when O₂ tension increases.

L-NAME (10mg/kg) did not cause any changes in the expression of Kv 1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1 in the DA in day 20 and day 21 fetus. The role of NO in dilating DA during fetal life may be minimal in the near-term fetal rat.

In conclusion, the decrease in the expression of Kv channels, which open in response to oxygen, may enhance the DA closure after birth by eliminating the effect of the opening of Kv channels when oxygen increases.

作成日 2007年 3月 10日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－中国人研究者・技術者招聘－報告書

19年 3月 13日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 平山 晃康 
所属機関名： 日本大学松戸歯学部
所属部署： 脳神経外科 職名： 教授
〒 271-8587
所在地： 千葉県松戸市栄町西2-870-1
電話： 047-360-9624 内線：

1. 助成金額： 100万 円

2. 研究テーマ

日本大学松戸歯学部病院における顎顔面外傷の動向

3. 成果の概要 (100字程度)

【目的】 当院における顎顔面骨骨折の動向について検討を行なった。【対象及び方法】 対象は2000年から2005年の6年間に日本大学松戸歯学部付属病院で入院加療を行なった顎顔面外傷257例である。【結果】 性別は男性191例 (74%)、女性66例 (26%) であり、男性に多く認められた。平均年齢は32歳で、最年少は6歳、最高齢は87歳であった。年齢分布は20歳代が80例 (31%) と最も多く、次いで10歳代が61例 (24%) であり、10歳代と20歳代を合わせると全体の55%を占めていた。骨折部位では下顎骨骨折が最も多かったが、2003年に脳神経外科が開設された後は、上顎骨、頬骨、眼窩底骨折などの中顔面骨骨折の増加が認められた。また、それに伴い症例数の増加が認められた。【結語】 今後さらに創意工夫を重ね治療期間の短縮や患者のQOLの向上を目指すべきである。

4. 被招聘者

氏名： 曲紅梅 職名： 副部長
所属機関： 清華大学玉泉病院 部署： 歯科

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

10月	日本大学松戸歯学部付属病院、	顎脳機能センター 痛み外来での研修
11月	日本大学松戸歯学部付属病院、	顎脳機能センター 摂食嚥下リハ外来での研修
12月	日本大学松戸歯学部付属病院、	顎脳機能センターでの研修 (MRI / CTの研修 歯周病学についての研修)

平成19年1月8日 中国に帰国

日本大学松戸歯学部病院における顎顔面外傷の動向

研究者氏名	曲 紅梅
中国所属機関	清華大学玉泉病院歯科
日本研究機関	日本大学松戸歯学部脳神経外科
指導責任者	教授 平山 晃康
共同研究者	浅澤裕一郎、安達直秀、秦由香里、 前田 剛、松崎肅統、牧山康秀

要 旨

当院における顎顔面骨骨折の動向について検討を行なった。【対象及び方法】対象は2000年から2005年の6年間に日本大学松戸歯学部付属病院で入院加療を行なった顎顔面外傷257例である。【結 果】性別は男性191例(74%)、女性66例(26%)であり、男性に多く認められた。平均年齢は32歳で、最年少は6歳、最高齢は87歳であった。年齢分布は20歳代が80例(31%)と最も多く、次いで10歳代が61例(24%)であり、10歳代と20歳代を合わせると全体の55%を占めていた。骨折部位では下顎骨骨折が最も多かったが、2003年に脳神経外科が開設された後は、上顎骨、頬骨、眼窩底骨折などの中顔面骨骨折の増加が認められた。また、それに伴い症例数の増加が認められた。【結 語】今後さらに創意工夫を重ね治療期間の短縮や患者のQOLの向上を目指すべきである。

目 的：

顔面と頭部はどちらも同じ球体に存在するため、外傷の機転がほぼ同一であり両者の合併損傷も多い。そのため顎顔面外傷は歯科と医科の領域に跨がる代表的疾患の一つであるといえる。2003年4月より歯科病院の診療科の一つとして当院に脳神経外科が全国に先駆けて開設された。本研究では当院における顎顔面骨骨折の動向について検討を行なった。

対象及び方法：

対象は2000年から2005年の6年間に日本大学松戸歯学部付属病院で入院加療を行なった顎顔面外傷257例である。診療録と放射線学的所見から、年齢・性別、受傷原因、骨折部位についてretrospectiveに検索を行なった。

結 果：

[性・年齢分布]

性別は男性191例(74%)、女性66例(26%)であり、男性に多く認められた。平均年齢は32歳で、最年少は6歳、最高齢は87歳であった。年齢分布は20歳代が80例(31%)と最も多く、次いで10歳代が61例(24%)であり、10歳代と20歳代を合わせると全体の55%を占めていた(Table 1)。

Table 1 年齢分布

年 齢	症例数	(%)
0-9	2	0.8
10 歳代	61	23.7
20 歳代	80	31.1
30 歳代	39	15.2
40 歳代	27	10.5
50 歳代	27	10.5
60 歳代	16	6.2
70 歳代	3	1.2
80 歳代	2	0.8
計	257	100

[受傷原因]

交通事故、転落・転倒、スポーツ、第三者行為の順に多く認められた (Table 2)。

Table 2 受傷原因

受傷原因	症例数	(%)
交通事故	100	39
転倒・転落	80	31
スポーツ	36	14
第三者行為	26	10
その他・不明	15	6
計	257	100

[骨折部位・症例数]

骨折部位では下顎骨骨折が最も多かったが、2003年に脳神経外科が開設された後は、上顎骨、頬骨、眼窩底骨折などの中顔面骨骨折の増加が認められた。また、それに伴い症例数の増加が認められた。(Table 3, 4, 5)。

Table 3 骨折部位 (2000-2005)

骨折部位	症例数	(%)
下顎骨骨折	176	68
上顎骨・頬骨骨折	50	19
頬骨弓部骨折	11	4
鼻骨骨折	7	3
眼窩底骨折	6	3
不明	7	3
計	257	100

Table 4 骨折部位 (2000-2002)

骨折部位	症例数	(%)
下顎骨骨折	88	80
上顎骨・頬骨骨折	14	12
頬骨弓部骨折	4	4
眼窩底骨折	0	0
鼻骨骨折	3	3
不明	1	1
計	110	100

Table 5 骨折部位 (2003-2005)

骨折部位	症例数	(%)
下顎骨骨折	88	60
上顎骨・頬骨骨折	36	24
頬骨弓部骨折	7	5
鼻骨骨折	4	3
眼窩底骨折	6	4
不明	6	4
計	147	100

考 察：

近年、当院における顎顔面外傷は増加している。これは生活の多様化による患者数の増加、近隣病院との病診連携の強化に加えて、当院が顎顔面外傷に対して、歯科と医科の連携により診療を行なっている点にあると考えられる。頭蓋内損傷を合併もしくは疑われる顎顔面外傷は、通常、歯科病院での治療対象になり難い。しかしながら、脳神経外科の治療終了後に顎顔面外傷の治療を開始すると Golden time を逸してしまい治療が困難になる症例が少なくない。当院では口腔外科と脳神経外科とのチーム医療により、意識障害や頭蓋内病変を伴った症例を積極的に受け入れる治療システムを構築している。このシステムは当院における顎顔面外傷の動向に影響を与えていると考えられた。

結 語：

顎顔面外傷に対する口腔外科と脳神経外科のチーム医療は当院の目指す "Medico-dental" の一つであり、今後さらに創意工夫を重ね治療期間の短縮や患者のQOLの向上を目指すべきである。

参考文献：

1. 前田 剛、春山秀遠、山下正義、大野奈穂子、石崎菜穂、長谷川一弘、田中茂男、渋谷 諄、小宮正道、牧山康秀、秋元芳明、平山晃康、片山容一：スポーツによる顎顔面骨骨折。脳神経外科ジャーナル 15: 517-522, 2006.

作成日：2007年3月13日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—日本人研究者派遣—報告書

2006年12月25日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った訪中交流について報告いたします。

添付資料： 訪中報告書

受給者氏名： 濱畑章子 
所属機関名： 聖隷クリストファー大学
所属部署： 看護学部 職名： 教授
〒433-8558
所在地： 静岡県浜松市三方原町3453
電話： 053-439-1400 内線： 1926

1. 助成金額： 200,000 円

2. テーマ

中国の看護教育への有効な活用に向けた日本の老年看護教育と質的研究の現状

3. 成果の概要（100字程度）

河北医科大学看護学院にて看護教員、看護師を対象に「日本における老年看護の発展」というテーマで講演し、また、看護学部や病院見学を通して意見交換し、交流した。

4. 招聘機関

機関名： 河北医科大学看護学院 代表者名： 趙 玲 職名： 院長
所在地： 河北省石家庄市和平西路215号

5. 滞在日程概要（日付、主な旅程・行事等）

平成18年9月16日 中部国際空港—上海
上海—蘇州（バス）：日中看護学会参加
平成18年9月19日 蘇州—上海（タクシー）
上海—石家荘（上海航空）
9月20日 河北医科大学看護学院院長、国際交流担当者、
党書記、河北医科大学第二医院副主任らと交流
9月21日 河北医科大学にて講演
9月22日 石家荘—北京（汽車）
9月24日 北京—中部国際空港

中国の看護教育への有効な活用に向けた日本の老年看護教育と質的研究の現状

研究者氏名 濱畑章子

所属機関 聖隷クリストファー大学老年看護学教授

はじめに

日本の高齢化率は 20.04%であり、看護教育でも、老年看護学の専門性が重視され、発展しつつある。中国の高齢化率は 7.69%であるが、将来の老親扶養や保健医療政策、老年看護学の専門性の確立や看護研究のレベル向上が重要課題である。今回、河北医科大学より招聘され、中国の老年看護教育と研究の発展に参考になるべく、日本の老年看護の現状と質的研究について講演し、交流したので報告する。

招聘期間:平成18年9月16日—9月24日

招聘機関:河北医科大学

結果

1. 河北医科大学看護学院の講義室や演習室などを見学し、日本の看護教育との相違など意見交換した。
2. 河北医科大学付属病院を見学し、日本の病院における看護の相違など意見交換した。
3. 河北医科大学看護学院で以下の内容で講演し、約300人の看護教員や付属病院の看護師が参加した。
 - 1) 日本の高齢化社会の現状
高齢化率の伸び、平均寿命の変化、高齢化の原因、現在の高齢者の生活の状態(家族構成や年収、就業割合等)、収入の種類、健康状態、死因、認知症と2005年に開始された政策的キャンペーン、介護保険
 - 2) 老年看護のカリキュラムの発展
看護教育に関する法律(保健師助産師看護師法)、老年看護学確立までの歴史的変遷、聖隷クリストファー大学の概要と講義中の学生の状況
 - 3) 老年看護学の教育内容
学生の高齢者に関するイメージや学生気質、老年看護学の科目目標と講義内容、実習目的と実習施設、学内演習、日本看護協会の認定による看護師の専門制度(専門看護師、認定看護師、認定看護管理者)
 - 4) 老年看護の研究の現状
老年看護学における研究内容(高齢者のケアの改善、介護家族のケア、認知症高齢者)、高齢者を対象とした質的研究の概要、日本における老年看護の今後の課題
 - 5) 施設の高齢者の生活を変えるケア
1990年から米国で始まった施設ケア改善の取り組みであるエデン・オルタナティブの紹介

おわりに

河北医科大学看護学院の教育は病院の環境を設定し、現実的で、合理的であった。学内で使用する物品は少ないが、教育方法の工夫によって対応していた。病院でも、物品の少ないのが目立った。講演では、日本の高齢化の原因や高齢者施設の看護、実際の老年看護教育の内容に関心が高かった。特に学生の学内演習を写したパワーポイントの写真を何枚も撮る人が多かった。高齢化で波及する問題や看護教育の内容には共通したものがあるが、日本で実際にどのように教えているのか、参考にしたいとの声があがっていた。今回の招聘で文化や習慣の相違により教育方法が異なっても、基盤は同じであることを確認した。また、一方的な講演ではなく、中国の看護教員の考え方や教育方法も参考になり、今後の教育活動に有意義な訪問であった。

河北医科大学より客員教授の授与



2006年9月19日

河北医科大学病院



2006年9月21日

河北医科大学病院看護師長



2006年9月21日

歓迎の垂れ幕

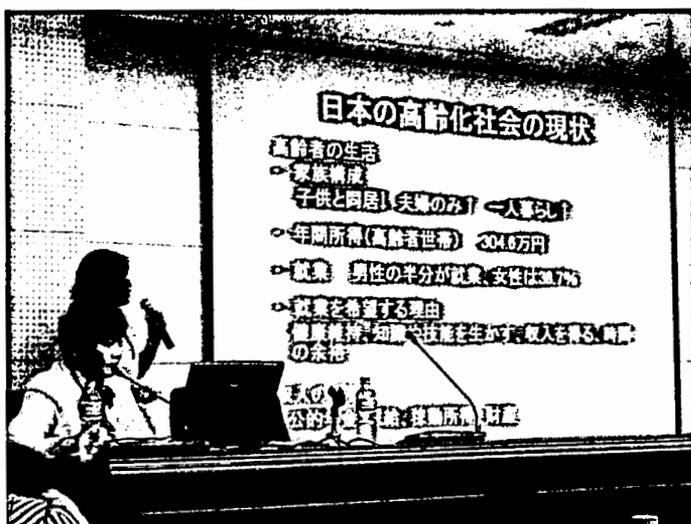


2006年9月21日

河北医科大学にて講演



2006年9月21日



2006年9月21日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金 一在留中国人研究者一報告書

2007 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 姜 晶



指導責任者名： 徳留 信寛 職名： 教授

所属機関名： 名古屋市立大学医学研究科健康増進予防医学
〒 467-8601

所在地： 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

電話： 052-853-8176 内線： 8176

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ADH2とALDH2遺伝子多型はアルコール消費による大腸腺腫感受性に影響を及ぼす

3. 成果の概要 (100字程度)

ADH2遺伝子は、性別、年齢などの交絡因子を補正して、Arg/Arg型がHis/His型に比べて、オッズ比は有意に高くなった(OR:2.40; 95%CI: 1.00-5.78)。ALDH2 遺伝子多型に関して、大腸腺腫の発症との関連は見られなかったが、ALDH2 Lys+型とADH2 Arg+型の多量飲酒者はリスクが高かった(OR: 8.39; 95%CI: 1.69-41.54)。遺伝要因が飲酒量によって大腸腺腫の発症リスクに影響すると考えられた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

Jiang J, Wang JW, Suzuki S, Gajalakshmi V, Kuriki K, Zhao Y, Nakamura S, Akasak S, Ishikawa H, Tokudome S. Elevated risk of colorectal cancer associated with the AA genotype of the cyclin D1 A870G polymorphism in an Indian population. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology (2006) 132: 193-199.

ADH2 と ALDH2 遺伝子多型はアルコール消費による大腸腺腫感受性に影響を及ぼす

研究者氏名 姜 晶
中国所属機関 河北大学付属病院腫瘍内科
日本研究機関 名古屋市立大学医学研究科健康増進・予防医学
指導責任者 教授 徳留 信寛
共同研究者名 鈴木貞夫、王静文

Abstract

Alcohol consumption is a probable risk factor with regard to colorectal neoplasm. Genetic polymorphisms, aldehyde dehydrogenase 2 (*ALDH2*) Glu487Lys and alcohol dehydrogenase 2 (*ADH2*) His47Arg, which have a strong impact on alcohol metabolism, are common in Japanese population but their significance for colorectal neoplasm remains to be clarified in detail. We therefore conducted a case-control study with 224 asymptomatic colorectal adenoma cases and 230 population-based controls matched for age and sex. After adjustment for sex, age, BMI, smoking status, drinking status, exercise, multivitamin consumption and family history of colorectal adenomas or cancers, the *ADH2* Arg allele was found to be associated with increased risk, the odds ratios (ORs) being 1.41 (95%CI: 0.92-2.18) and 2.40 (1.00-5.78) for the His/Arg and Arg/Arg genotypes, respectively. Whereas no significant association was found for *ALDH2* genotypes. In heavy drinkers, having *ALDH2* Lys+ with *ADH2* Arg+ showed ORs of 8.39 (1.69-41.54), compared with non drinkers, having *ALDH2* Glu/Glu with *ADH2* His/His. In conclusion, the present study suggests the polymorphisms of *ADH2* and *ALDH2* can modify the influence of alcohol consumption on colorectal adenomas risk.

Key Words colorectal adenomas, drinking, gene-environment interaction, *ALDH2*, *ADH2*.

Introduction

The majority of colorectal cancer is thought to arise from adenomas, Alcohol consumption is a probable risk factor with respect to colorectal adenomas and colorectal cancers¹⁾. This increased risk might be caused by ethanol via cocarcinogenesis, induction of DNA hypomethylation, or tumor promotion, but might also result from its metabolite acetaldehyde, which was qualified as a probable carcinogen to humans. Alcohol is oxidized to acetaldehyde by the alcohol dehydrogenase enzymes (ADHs), especially by *ADH2*. Acetaldehyde is further oxidized into acetate by aldehyde dehydrogenase enzymes (ALDHs), and this oxidation owes much to *ALDH2*. Encoding genes for these two representative alcohol-oxidizing capabilities and drinking behavior. Regarding *ADH2* Arg/His, the 47His allele represents a superactive subunit of *ADH2* that has about a 40 times higher than the less-active Arg/Arg from of *ADH2*. As for the *ALDH2* Glu487Lys polymorphism, the 487Lys allele, encodes a catalytically inactive subunit. Individuals with the *ALDH2* Glu/Lys genotype have only 6.25% of normal *ALDH2* 487Glu protein; indicating a dominant effect of *ALDH2* 487Lys. The *ADH2* 47His and *ALDH2* 487Lys alleles leading to high acetaldehyde concentrations, are clustered in East Asian populations such as Japanese and Chinese. Therefore, these two genetic polymorphisms modify the drinking habit and are expected to affect CRC and colorectal adenomas risk. However, rare evidence is available for the combined impact of *ADH2* and *ALDH2* polymorphisms on colorectal adenomas risk by alcohol drinking.

The primary aim of this case-control study is to investigate the impact of *ADH2* and *ALDH2* polymorphisms on colorectal adenomas risk. We also evaluated potential interactions between the two polymorphisms and alcohol consumption with regard

to colorectal adenomas risk.

Materials and Methods

Subject selection and data collection:

The participants and data collection method for this case-control study have been described previously in detail²). Briefly, 224 colorectal adenoma cases (159 men, 65 women) and 230 healthy controls (160 men, 70 women), frequency matched for age and sex, were recruited. Detailed information on demographic characteristics, personal medical history, usual physical activity, cigarette smoking and drinking habits, intake of multivitamins, and history of colorectal adenomas or cancer in the first-degree relatives were collected by trained interviewers. Alcohol use was categorized into never and ever use with consumption of <30 or ≥30 ml of ethanol per day.

Genotyping of *ALDH2* and *ADH2*:

DNA of each subject was extracted from the buffy coat fraction. Genotyping was based upon duplex PCRs with the confronting two-pair-primer (PCR-CTPP) method³). Briefly, four primers for the *ADH2* polymorphism and four primers for the *ALDH2* polymorphism were mixed in a 25µl volume with 0.2mM dNTPs, 0.5U of AmpliTaq Gold DNA polymerase and 2.5µl×10 PCR buffer including 15 mM MgCl₂. The results were confirmed by the PCR restriction fragment length polymorphism method using MspI for both polymorphisms.

Statistical analysis:

Differences of characteristics between cases and controls were assessed using the Chi-square test. The Hardy-Weinberg equilibrium was checked with the Chi-square test. Unconditional logistic regression analysis was employed to estimate the odds ratios (ORs) and confidence intervals (95% CIs) for the association between genotypes and risk of colorectal adenomas. Adjustments were made for matching variables (age, sex) and for possible confounders. Covariates were identified as potential confounders by examining their distribution by case-control status. The covariates were included in the model if they changed the ORs by more than 20% or significantly changed the likelihood ratio statistic ($p < 0.05$) on univariate analysis. All statistical tests were two-sided and differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$. All analyses were performed using SAS software, version 8.20 (SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA).

Results

Demographic and lifestyle characteristics of the 224 colorectal adenoma cases and 230 controls are shown in Table 1. Differences were observed in the distribution of cigarette smoking between cases and controls ($p = 0.001$ for males). A significantly higher proportion of cases with a family history of colorectal adenomas or cancer than controls were found ($p = 0.01$). There were no significant differences in the distribution of sex, body mass index, drinking status, vigorous exercise, or multivitamin consumption between cases and controls.

Table 2 shows genotype distributions for *ADH2* and *ALDH2* and combination, and their ORs and 95% CIs for colorectal adenomas. The genotype frequencies for all the polymorphisms were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium in controls and allele frequencies were also in accordance with earlier reports in Japan. Significantly increased risk of colorectal adenomas was observed with Arg/Arg relative to His/His (OR: 2.45; 95%CI: 1.06-5.66; trend=0.005 for model 1), whereas no significant elevation of risk was observed with the *ALDH2* genotype alone. In the analysis for combination, compared with subjects having *ALDH2* Glu/Glu with *ADH2* His/His, age-sex adjusted ORs and 95% CIs for those with *ALDH2* Glu/Glu and *ADH2* Arg+, *ALDH2* Lys+ and *ADH2* His/His, and *ALDH2* Lys+ and *ADH2* Arg+ were 1.32 (0.81-2.16), 0.79 (0.49-1.29), and 1.56 (0.92-2.61), respectively. A model including confounders showed similar association.

In Table 3, the impact of combined genotypes on CRC risk stratified by alcohol drinking is presented as ORs adjusted for sex, age, BMI, smoking status, drinking status, exercise, multivitamin consumption and family history of colorectal adenomas or

cancers. In heavy drinkers, having *ALDH2* Lys+ with *ADH2* Arg+ showed ORs of 8.39 (1.69-41.54), compared with non drinkers, having *ALDH2* Glu/Glu with *ADH2* His/His.

Discussion

In present study found subjects with *ADH2* Arg allele had a higher risk of developing colorectal adenoma than those with *ADH2* His/His genotype, and also found that high alcohol consumption most markedly increased the risk of colorectal adenomas in subjects with *ADH2* Arg allele and *ALDH2* Lys allele.

Previous epidemiological studies also reported a significantly higher risk for colorectal cancer and esophageal cancer among Japanese with *ADH2* Arg allele, compared to those with *ADH2* His/His genotype^{1,4,5}. There are possible explanations for the effects of *ADH2* on carcinogenesis. The high risk *ADH2* encoded by *ADH2* Arg allele might be exposed to lower dose of acetaldehyde following heavy alcohol drinking for hours. Especially, individuals with both the *ADH2* Arg allele and *ALDH2* Lys allele tend not to experience alcohol flushing, and diminished intensity of the aversive flushing response has been found to be positively associated with daily alcohol consumption⁹. Subjects who consumed alcoholic beverages and carried susceptible genotypes experienced a increase in risk of developing colorectal adenomas, much higher than those who were non-drinkers and did not carry susceptible genotypes of *ADH2* and *ALDH2*.

The *ADH2* Arg allele might, under certain conditions, increase the risk for colorectal adenomas via mechanisms of the interaction between genes and drinking behavior. Our present findings can provide additional information about the role of alcohol on colorectal adenomas in Japan.

References

1. Matsuo K, Wakai K, Hirose K, Ito H, Saito T, Suzuki T, Kato T, Hirai T, Kanemitsu Y, Hamajima H, Tajima K. A gene-gene interaction between *ALDH2* Glu487Lys and *ADH2* His47Arg polymorphisms regarding the risk of colorectal cancer in Japan. *Carcinogenesis*. 2006 May; 27(5): 1018-23.
2. Jiang J, Suzuki S, Xiang J, Kuriki K, Hosono A, Arakawa K, Wang J, Nagaya T, Kojima M, Katsuda N, Tokudome S. Plasma carotenoid, alpha-tocopherol and retinol concentrations and risk of colorectal adenomas: A case-control study in Japan. *Cancer Lett*. 2005 Aug ; 226(2):133-41.
3. Tamakoshi,A., Hamajima,N., Kawase,H., Wakai,K., Katsuda,N., Saito,T., Ito,H., Hirose,K., Takezaki,T. and Tajima,K. Duplex polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for genotyping alcohol dehydrogenase beta subunit (*ADH2*) and aldehyde dehydrogenase 2 (*ALDH2*). *Alcohol and Alcoholism*. 2003 June; 38: 407-10.
4. Yokoyama A, Kato H, Yokoyama T, Tsujinaka T, Muto M, Omori T, Haneda T, Kumagai Y, Igaki H, Yokoyama M, Watanabe H, Fukuda H, Yoshimizu H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2002 Nov; 23(11): 1851-9.
5. Yokoyama A, Omori T. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers. *Jpn J Clin Oncol*. 2003 Mar;33(3):111-21.
6. Matsuo K, Wakai K, Hirose K, Ito H, Saito T, Tajima K. Alcohol dehydrogenase 2 His47Arg polymorphism influences drinking habit independently of aldehyde dehydrogenase 2 Glu487Lys polymorphism: analysis of 2,299 Japanese subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 May; 15(5):1009-13;

2007年3月10日作成

Table 1. Characteristics of cases with colorectal adenomas and controls

	Cases (%) (n=224)	Controls (%) (n=230)	P*
Sex			
Male	159 (71.0)	160 (69.6)	0.74
Female	65 (29.0)	70 (30.4)	
Age (years)			
50-59	77 (34.4)	58 (25.2)	0.11
60-69	116 (51.8)	135 (58.7)	
70-75	31 (13.8)	37 (16.1)	
Body mass index (kg/m ²)			
<20.0	27 (12.1)	29 (12.6)	0.06
20.0-24.9	134 (59.8)	158 (68.7)	
25.0-	63 (28.1)	43 (18.7)	
Cigarette smoking (pack-years)			
0	70 (31.2)	124 (53.9)	0.001
1-20	38 (17.0)	38 (16.5)	
>20	116 (51.8)	68 (29.6)	
Drinking status			
Never	79 (35.3)	104 (45.2)	0.09
Ever	145 (64.7)	126 (54.8)	
Moderate drinkers (<30ml/d)	83 (37.0)	71 (30.9)	
heavy drinkers (30ml/d-)	62 (27.7)	55 (23.9)	
Exercise			
Yes	140 (62.5)	134 (58.3)	0.36
No	84 (37.5)	96 (41.7)	
Multivitamin consumption			
Current	53 (23.7)	45 (19.6)	0.57
Occasional	15 (6.7)	16 (6.9)	
Never	156 (69.6)	169 (73.5)	
Family history of colorectal adenomas and cancer			
No	189 (84.4)	212 (92.2)	
Yes	35 (15.6)	18 (7.8)	0.01

* Examined by *t*-test or Chi-square test.

Table 2. Genotype distributions of *ADH2* and *ALDH2* polymorphisms

	Cases	Controls	Model 1		Model 2	
			OR	95%CI	OR	95%CI
<i>ADH2</i>						
His/His	128	154	1.00	Reference	1.00	Reference
His/Arg	78	67	1.37	0.91-2.05	1.41	0.92-2.18
Arg/Arg	18	9	2.45	1.06-5.66	2.40	1.00-5.78
<i>ALDH2</i>						
Glu/Glu	142	140	1.00	Reference	1.00	Reference
Glu/Lys	70	74	0.93	0.62-1.39	0.93	0.61-1.42
Lys/Lys	12	16	0.81	0.36-1.75	0.83	0.36-1.93
<i>ALDH2</i> and <i>ADH2</i>						
Glu/Glu and His/His	84	94	1.00	Reference	1.00	Reference
Glu/Glu and Arg+	58	48	1.32	0.81-2.16	1.38	0.82-2.33
Lys+ and His/His	44	62	0.79	0.49-1.29	0.78	0.46-1.30
Lys+ and Arg+	38	26	1.56	0.92-2.61	1.62	0.94-2.81

Model 1 adjusted for sex and age;

Model 2 adjusted for sex, age, BMI, smoking status, drinking status, exercise, multivitamin consumption and family history of colorectal adenomas or cancers.

Table 3. Genotype distributions of *ADH2/ALDH2* according to drinking status and their ORs and 95% CIs for colorectal adenomas

	<i>ALDH2</i> Glu/Glu		<i>ALDH2</i> Lys+	
	<i>ADH2</i> His/His	<i>ADH2</i> Arg+	<i>ADH2</i> His/His	<i>ADH2</i> Arg+
ORs(95%CIs) for colorectal adenomas stratified by drinking levels				
All subjects	1.00 (Reference)	1.38 (0.82-2.33)	0.78 (0.46-1.30)	1.52 (0.83-2.81)
Non-drinkers	1.01 (Reference)	1.01 (0.39-2.64)	0.77 (0.35-1.71)	1.31 (0.53-3.26)
Moderate drinkers	1.02 (Reference)	0.87 (0.35-2.17)	0.59 (0.22-1.57)	0.93 (0.29-2.98)
Heavy drinkers	1.03 (Reference)	1.59 (0.72-5.29)	0.59 (0.12-2.75)	3.07 (1.61-19.5)
ORs(95%CIs) for colorectal adenomas compared with non-drinker having <i>ADH2</i> His/His and <i>ALDH2</i> Glu/Glu				
Non-drinkers	1.00 (Reference)	0.99 (0.41-2.41)	0.97 (0.47-2.03)	1.39 (0.92-3.24)
Moderate drinkers	1.89 (0.58-3.33)	1.61 (0.72-3.65)	1.73 (0.70-4.31)	1.23 (0.45-3.37)
Heavy drinkers	1.13 (0.52-4.29)	1.94 (0.97-7.34)	0.36 (0.39-1.43)	8.39 (1.69-41.54)

ORs adjusted for sex, age, BMI, smoking status, drinking status, exercise, multivitamin consumption and family history of colorectal adenomas or cancers.

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2007年 3月 2日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 張 影



指導責任者名： 小濱 一弘

職名： 教授

所属機関名： 群馬大学大学院医学系研究科・臓器病態薬理学

〒371-8511

所在地： 群馬県前橋市昭和町3-39-22

電話： 027-220-7962

内線： ダイヤルイン

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

カルシウム感受性ミオシンの構造と機能—分子生物学的アプローチ—

3. 成果の概要 (100字程度)

フィザルムという下等有核生物のミオシンはCa²⁺の結合によって活性に障害を受けるが、このミオシンのcDNAをクローニングして、発現蛋白質として得ることができました。このミオシンにはモーター活性があり、Ca²⁺の障害を受けることが再現できた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

日本薬理学会：カルシウム感受性真性粘菌ミオシンIIの発現と性質

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

Regulatory mechanisms of striated muscle contraction. Calcium inhibition of Physarum myosin as examined by the recombinant heavy mero-myosin. pp.257-264, Springer Verlag, 2006

カルシウム感受性ミオシンの構造と機能-分子生物学的アプローチ-

研究者氏名 張 影
日本研究機関 群馬大学医学部臓器病態薬理学
指導責任者 小濱一弘 教授
共同研究者 川道穂津美, 中村彰男, 吉山伸司

要 旨

Myosin II is one of the typical motor proteins and is classified as non-regulated, phosphorylatable and Ca-binding myosins. *Physarum* and scallop myosin II belongs to Ca-binding one. However, Ca^{2+} works as an inhibitor for *Physarum* myosin and as an activator for scallop myosin. This similarity in the subunits composition has raised the question of what subunit determines the inhibitory and stimulatory effects of Ca^{2+} . Myosin II regulated by Ca-binding has not yet expressed as a recombinant protein. Here, we report the expression of *physarum* myosin II together with preliminary characterizations.

Key Words motility assay, calcium, recombinant myosin II, actin

緒 言

Plasmodia of *Physarum polycephalum* shows vigorous cytoplasmic streaming by changing direction every few minutes. This oscillatory streaming is regulated by Ca^{2+} and is thought to be driven by a conventional myosin. It has been known that the superprecipitation of actomyosin preparation or myosin B from the plasmodia to examine the effect of Ca^{2+} . It superprecipitated without requiring Ca^{2+} . When Ca^{2+} at μM level was present, the superprecipitation was inhibited. This calcium inhibition was quite the opposite of the superprecipitation of actomyosin from vertebrate muscles, and we expected that the inhibitory mode could be involved in the plant cytoplasmic streaming. With the finding of the diverse classes of unconventional myosin such as myosin I and V in vertebrate muscles, the inhibitory mode was shown to play a role in cell motility in both animal and plant kingdoms. In this case the myosins have calmodulin (CaM) as the light chains and are regulated by interaction of Ca^{2+} with CaM, which exerts an inhibitory effect on activity. Since of the findings of calcium inhibition in the plasmodia, efforts have been made to define the way in which Ca^{2+} regulates the actomyosin system, leading to the discovery that, while that *Physarum* myosin is the major site of action of Ca^{2+} , actin-linked regulation through actin-binding protein is involved in the inhibition. Further biochemical studies on the myosin-linked regulation showed that Ca^{2+} binding to the Ca-binding light chain (CaLC) inhibits the activity of *Physarum* myosin. Similar to *Physarum* myosin, mollusk scallop myosin belongs to the myosinII isoform family and the activity of scallop myosin is regulated by Ca^{2+} . However, the effect of Ca^{2+} on this myosin is in an opposite to the regulation of *Physarum* myosin; Ca^{2+} activates the activity. Because structure and function in relation to the regulation by Ca^{2+} are known better for scallop myosin than that of *Physarum* myosin. We adopted a strategy to compare the two myosins for a better understanding of Ca^{2+} regulation. As the first step to analyze how Ca^{2+} exerts a regulatory role on *Physarum* myosin through binding to CaLC, we tried to obtain recombinant myosin and heavy mero-myosin of *Physarum* myosin (HMM).

対象と方法

We used baculovirus expression system. Sf9 cells were infected with the virus constructs.

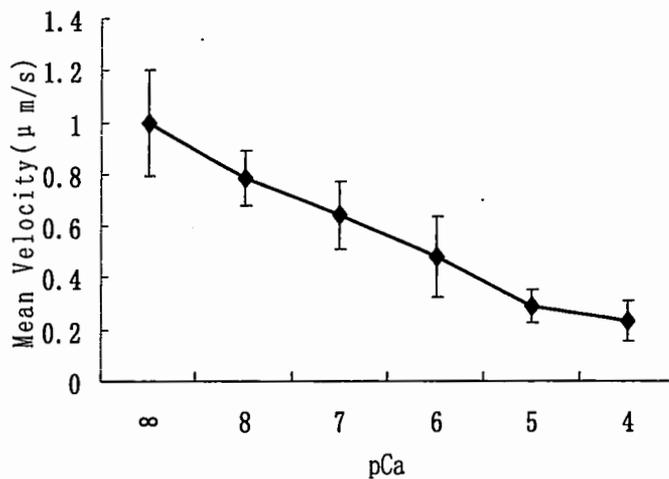
結 果

(1) Ca^{2+} inhibited sliding velocity of actin filaments propelled by recombinant full length myosin II and HMM of *Physarum polycephalum*, and as the concentration of calcium increased, the inhibition was stronger. But inhibition is stronger for full length myosin II, suggesting LMM maybe affected the sensitivity of myosin for Ca^{2+} .

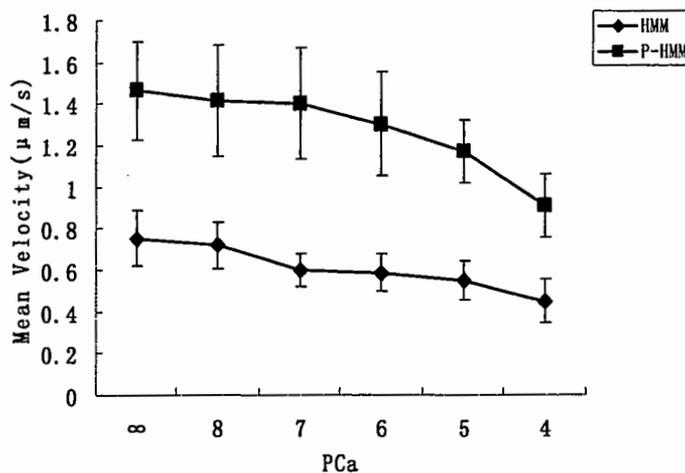
(2) The velocity of actin filaments caused by phosphorylated HMM was higher than unphosphorylated HMM, which agreed with the characters of Mg^{2+} -ATPase activity of myosin II before.

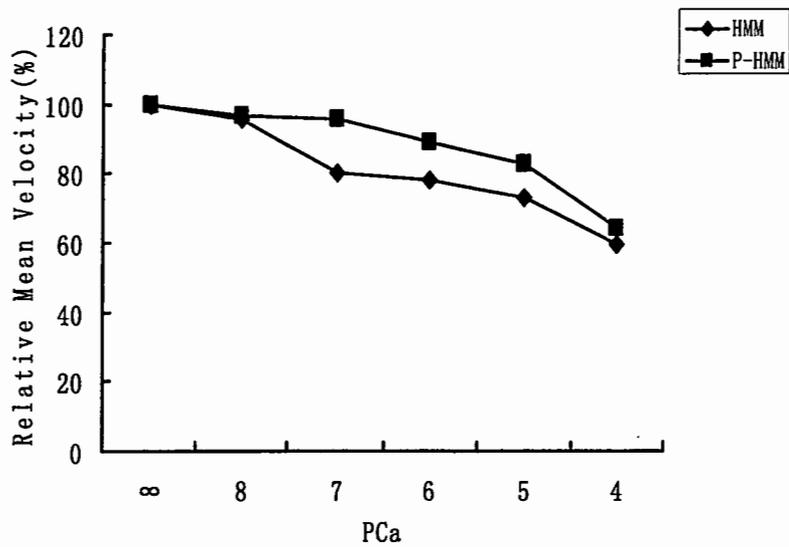
(3) Calcium could not impact the sliding velocity of actin filaments by mutant recombinant myosin II (it lacks calcium binding cite), suggesting that Ca^{2+} regulated the function of *physarum* myosin by binding with Ca^{2+} -binding light chain (CaLC).

1. The effect of calcium on the sliding velocity of actin-filaments on a glass surface coated with unphosphorylated *physarum* myosin.

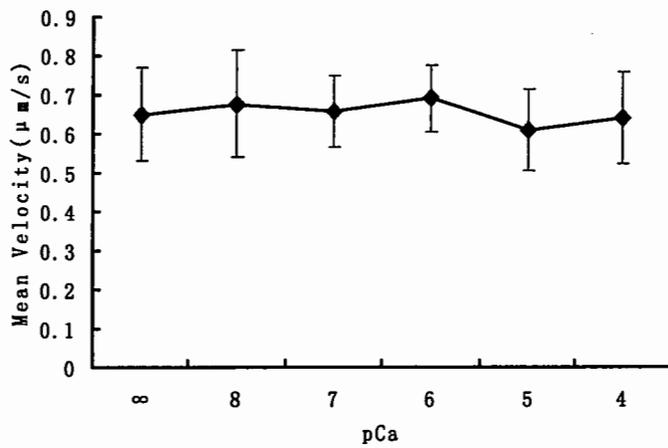


2. The effect of calcium on the sliding velocity of actin-filaments on a glass surface coated with unphosphorylated and phosphorylated HMM.

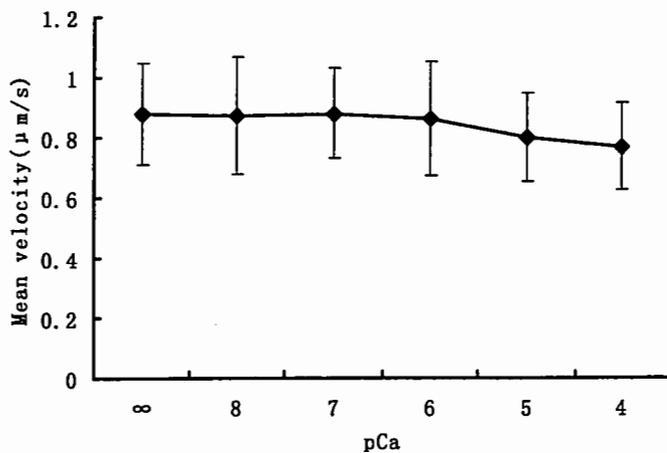




3. The effect of calcium on the movement of actin filaments on the mutant full length myosin-coated glass surface.



4. The effect of calcium on the sliding velocity of actin-filaments on a glass surface coated with mutant HMM.



考 察

To understand regulation of myosin II isoforms by Ca^{2+} comprehensively, i. e., including both activation and inhibition modes, we have expressed the hybrid HMM, it is consisted of physarum heavy chain, physarum regulatory light chain and scallop essential light chain, expecting the functional hybrid HMM. But we found that scallop essential light chain could not bind to physarum heavy chain.

参考文献

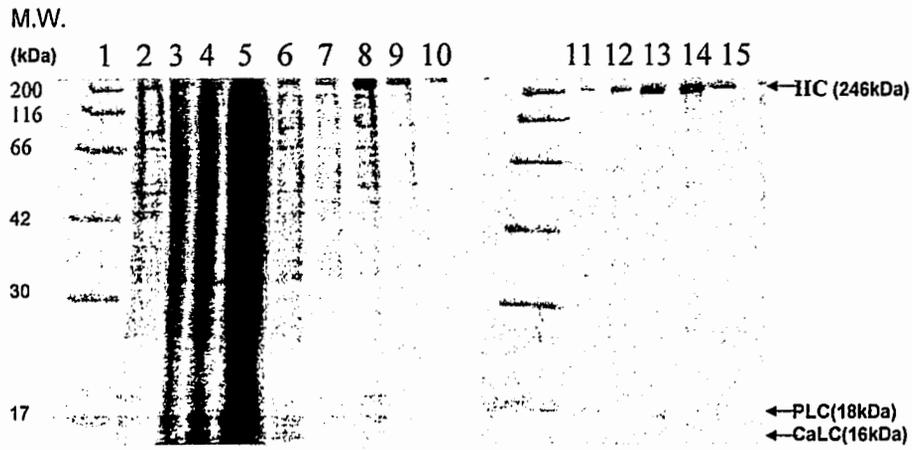
1. Kohama K, Kohama T, Kendrick-Jones J. The inhibitory Ca^{2+} -regulation of the actin-activated Mg-ATPase activity of myosin from *Physarum polycephalum* plasmodia. *J Biochem.* 1986, 99, 1433-1446.
2. Hozumi Kawamichi. Characterization of recombinant Heavy Meromyosin of *Physarum polycephalum*. *Kitakanto Med J.* 2002, 52, 89-97.
3. Kohama K, Sohda M, Maruyama K, et al. Domain structure of *Physarum* myosin heavy chain. *Protoplasma.* 1988, 2, 37-47.
4. Kohama K, Kohno T, Okagaki T, et al. Role of actin in the myosin-linked Ca^{2+} -regulation of ATP-dependent interaction between actin and myosin of a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *J Biochem.* 1991, 110, 508-513.
5. Akio Nakamura and Kohama, K. Calcium regulation of the actin-myosin interaction of *Physarum polycephalum*. *International Review of Cytology*, 1999, 191, 53-98.
6. Ogihara, S., Ikebe, M., Takahashi, K. and Tonomura, Y. Requirement of phosphorylation of *Physarum* myosin heavy chain for thick filament formation, actin activation of Mg-ATPase activity, and Ca^{2+} -inhibitory superprecipitation. *J Biochem.* 1983, 93, 205-223.
7. Farkas, L., Andrási Málnási-Csizmadia, Nakamura, A., Kohama, K. and László Nyitray. Localization and characterization of the inhibitory Ca^{2+} -binding site of *Physarum polycephalum* Myosin II. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278, 27399-27405.
8. Kohama K. Heterogeneity of amino acid incorporation rate in adult skeletal muscle actin. *J Biochem.* 1980, 87, 997-999.

注：(1) 本研究は2007年3月16日に日本薬理学会で「カルシウム感受性真性粘菌ミオシン II の発現と性質」発表。

(2) Hozumi Kawamichi, Ying Zhang, Mizuki Hino, Akio Nakamura, Hideyuki Tanaka, László Farkas, László Nyitray, Kazuhiro Kohama. Calcium inhibition of *Physarum* myosin as examined by the recombinant heavy mero-myosin. In: *Regulatory mechanisms of striated muscle contraction*. Eds: S. Ebashi & I. Ohtsuki. pp257-264, Springer Verlag, (2006)

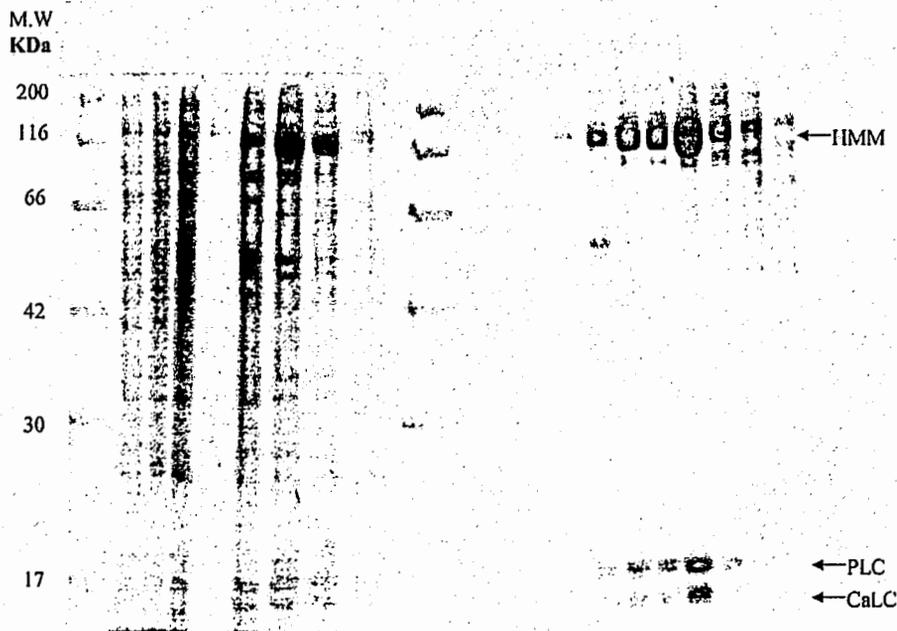
作成日 2007/03/01

1. SDS-PAGE of purification steps of recombinant myosin of *Physarum polycephalum*



- 1: Molecular weight marker
- 2: Sup. of *Sf-9* uninfected homogenate
- 3: Ppt. of *Sf-9* homogenate infected with both HC and LCs
- 4: Sup. of *Sf-9* homogenate infected with both HC and LCs.
- 5: Sup. after the ultracentrifugation in the presence of ATP
- 6: effluence after using Ni-NTA column
- 7-10: Purified *physarum* myosin by using Ni-NTA column
- 11-15: Purified *physarum* myosin by using Superose™6 column with HPLC

2. SDS-PAGE of purified recombinant HMM of *Physarum polycephalum*



財団法人日中医学協会
2006 年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006 年 03 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名： 瀋 継偉 

指導責任者名： 安保 徹 職名： 教授

所属機関名： 新潟大学大学院医歯学総合研究科

所在地： 〒951-8520 新潟市旭町通 1-757

電話： (025)227-2137 内線： 2137

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ：

絶食マウスにおけるリンパ球の性状及び機能の経時的解析

3. 成果の概要 (100 字程度)

この研究結果はだんだんに出てきて、これからの研究の発展が大きく期待されているところです。教授先生の高い評価を受けました。一部のデータは第 36 回日本免疫学会総会・学術集会上に発表しました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (学会名・演題)

1) 瀋 継偉、富山 智香子、任 宏偉、飯合 恒夫、神田 泰洋、川村 弘樹、川村 俊彦、安保 徹。
Analysis of lymphocytes of fasting mice. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会. 2006 年 12 月 11 日~13 日. 日本・大阪.

2) 瀋 継偉、富山 智香子、任 宏偉、飯合 恒夫、川村 俊彦、安保 徹. β -グルカン投与マウスにおける腸管上皮間リンパ球 (IEL) の経時的解析. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会. 2005 年 12 月 13 日~15 日. 日本・横浜

(2) 発表した論文 無 ・ (雑誌名・題名)

1) Jiwei Shen, Hongwei Ren, Chikako Tomiyama-Miyaji, Yasuyo Suga, Tetsuya Suga, and Toru Abo. Potentiation of intestinal immunity by micellary mushroom extracts. Biomedical Research.4(2007). (印刷中)。

2) Hongwei Ren, Jiwei Shen, Chikako Tomiyama-Miyaji, Mayumi Watanabe, Eisuke Kainuma, Masashi Inoue Yuh Kuwano, Toru Abo. Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation. Cellular Immunology(2007).(印刷中)

3) X.Bai, S.Wang, C.Tomiyama-Miyaji, J.Shen, T.Taniguchi, N.Izumi, C.Li, H.Y.Balir, T.Nagura, S.Takahashi, T.Kawamura, T.Iiai, H.Okamoto, K.Hatakeyama, T.Abo. Transient Appearance of Hepatic Natural Killer Cells with High Cytotoxicity and Unique Phenotype in Very Young Mice. Scandinavian Journal of Immunology(2006) 63, 275-281.

絶食マウスにおけるリンパ球の性状及び機能の経時的解析

研究者氏名	潘 継偉
中国所属機関	黒竜江省医院消化器外科
日本研究機関	新潟大学大学院医歯学総合研究科免疫・医動物教室
指導責任者	教授 安保 徹
共同研究者名	任 宏偉, 富山 智香子, 神田 泰洋, 飯合 恒夫

要 旨

低栄養状態は従来より、免疫機構に不利になると考えられてきた。しかし、我々は低蛋白食を与えたマウスは移植された腫瘍を拒絶すること、およびマラリア感染に抵抗性を持つことを報告している。そこで、短期絶食における免疫機構への影響を調べた。材料と方法：成体 C57BL/6 マウスに飼料のみを与えず、飲水については自由とし、絶食モデルを作成した。絶食後 1, 2, 3 日後に、肝、脾、胸腺、小腸から常法にて単核球を分離し、各臓器より分離した単核球をフローサイトメトリーにて細胞表面抗原の解析を行った。細胞傷害活性を測定するために、4 時間 ^{51}Cr 遊離試験を行った。標的細胞は Yac-1 及び B6 胸腺細胞を用いた。また、絶食マウスにおける細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った。結果と考察：全単核球数について、絶食期間が長くなる毎に明らかな減少を認めた。フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析では、肝臓の $\text{CD3}^{\text{int}}\text{IL-2R}\beta^{\text{int}}$ 細胞が増加し、その中でも $\alpha\beta\text{TCR}^{\text{int}}\text{NKT}$ 細胞の割合が顕著であった。小腸では $\text{CD8}\alpha^{\text{int}}\text{B220}^{\text{int}}\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}$ 細胞の割合の増加が認められた。細胞内サイトカインの解析については肝及び脾臓 NK、NKT 細胞は絶食 1 日目で $\text{IFN-}\gamma$ 及び IL-4 が増加したものの、2、3 日目では低下した。さらに、細胞傷害活性試験においては、肝のみ絶食 1 日目で活性が最大となり、2、3 日目では減少した。以上の結果より、一時的な低栄養状態では免疫能の低下ではなく、逆に増強していることが示唆された。

Key Words 絶食, 肝臓, 細胞表面抗原, 細胞傷害活性, 自然免疫

結 言

栄養状態は生体防御機構である免疫機能に大きく影響を及ぼしていることが知られているが、摂取する食物の量や質、あるいは栄養状態によって免疫機能が強く影響を受けることが明らかになってきた。従来より、低栄養状態（栄養失調状態）になると、免疫力が低下し、基礎疾患などがさらに症状を悪化させるという悪循環に陥る可能性が出てくると考えられてきた。

しかし、筆者らの研究室はマウスに低蛋白食含有の餌を与え、腫瘍への抵抗性及びマラリア感染防御に対する影響ということ報告している^{1) -5)}。低蛋白ダイエットにより、胸腺萎縮が誘導されてメインストリームの T 細胞が抑制され、逆に肝臓における自然免疫を活性化することが明らかとなった。その結果、低蛋白ダイエットにより、移植された腫瘍を拒絶した。そして、非致死性のみならず致死性のマラリア感染に抵抗性を獲得した。NK、NKT 細胞の機能が増強し、自然免疫を増強した^{5) -9)}。

そこで、本研究では、短期絶食におけるマウスリンパ球の phenotype と機能の点を中心に解析して、免疫機構への影響を調べた。

材料と方法

1、マウス

8~12 週齢の C57BL/6 (B6) を用いた。上記マウスは新潟大学動物実験施設にて SPF 環境で飼育されたものである。

2、絶食モデルの作成

マウスに飼料のみを与えず、飲水については自由とし、絶食モデルを作成した。

3、単核球の調製

絶食後 1, 2, 3 日後に、定法にて肝臓、脾臓、胸腺、および小腸上皮より単核球の分離を行った^{10),11)}。

マウス胸腺、肝臓と脾臓を細切後、200 ゲージのステンレスメッシュを通し、Eagle's MEM(Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)で洗浄後、胸腺の単核球を分離した。脾臓は 0.2% NaCl で溶血させ、単核球を分離した。肝臓は 35%percoll で比重遠心した後、0.83%NH⁴CL-Tris buffer(ph7.6)で溶血させ、単核球を分離した。

小腸は PBS で腸管内容物を洗い出し、パイエル板を切除した。その後、腸管を長軸方向に切開し、約 1.5 センチの長さに裁断しながら、20 ml の skating-water(Ca²⁺- and Mg²⁺- free Dulbecco's PBS containing 5 mM EDTA)の中に移し、分間培養した。液体が白濁しているのを確認した後、腸管を除けながら、上清を取り出した。25 分間 40%80%percoll で勾配遠心した後、interface を採取した。MEM で洗浄後、単核球を分離した。

4、フローサイトメトリーによる解析

マウスより分離した単核球を抗マウスモノクローナル抗体で二重及び三重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った¹²⁾。

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoery-thrin(PE)及び biotin 標識された以下の抗マウスモノクローナル抗体を使用した。FITC-conjugated anti-CD3 (145-2C11), anti-CD8 α (53-6.7), PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136), anti-IL-2R β (TM- β 1), anti-CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-CD4 (PM4-5), anti-CD8 β (53-5.8), biotin-conjugated anti-TCR $\alpha\beta$ (H57-597), anti-TCR $\gamma\delta$ (GL3) mAbs (BD PharMingen Co., San Diego, CA) を使用した。

5、細胞内サイトカインの解析

絶食マウスにおける細胞内サイトカイン IFN- γ 及び IL-4 の染色を行い、フローサイトメトリーで解析を行った。実験前 2 時間、ConA (Sigma,USA) を刺激物として、i.v.で 200 μ g/mouse 投与した。

6、⁵¹Cr 遊離法による細胞傷害活性解析

常法にて 4 時間 ⁵¹Cr 遊離試験を行った¹³⁾。標的細胞は YAC-1 及び B6 胸腺細胞を用いた。Effector 細胞には肝臓、脾臓から得た単核球細胞を用いた。

結果

1、絶食後各臓器の単核球数の変化

絶食後 1, 2, 3 日目、全単核球数について、対照群と比べ、絶食期間が長くなる毎に有意に減少を認めた(図 1)。肝臓、脾臓、小腸は絶食後 3 日目で全単核球数が約対照群の四分の一に減少したが、胸腺は約八分の一に減少した。(n=4, p<0.05)

2、細胞表面抗原の解析

絶食後マウスの NKT 細胞の変化を比べるために、対象群と絶食群マウス肝及び脾単核球を、抗 CD3 及び IL-2R β , CD3 及び NK1.1 の二重染色で解析を行った(図

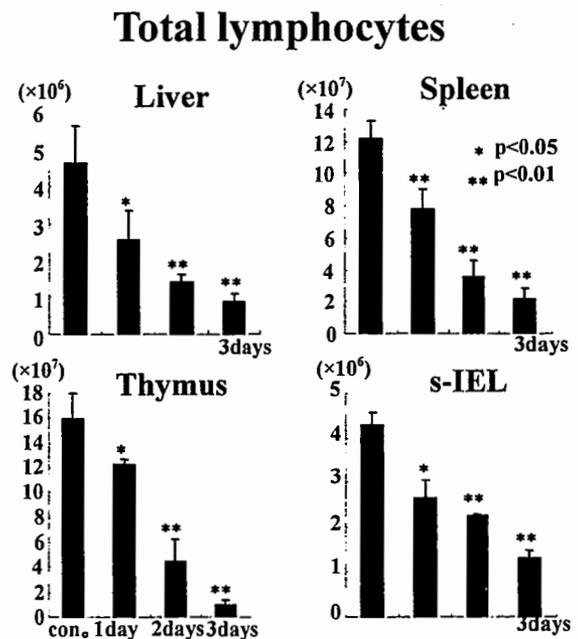


図1. 各臓器の単核球数を示す。

2)。肝の胸腺外分化 T 細胞は IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞として同定できる。IL-2Rβ⁺CD3⁻は NK 細胞であり、IL-2Rβ⁻CD3^{high} 細胞が胸腺由来 T 細胞である¹⁴⁾。

NK 細胞及び胸腺外分化 T 細胞は肝に豊富に存在するが、脾に少ない。対照群と比べ、絶食群マウスの肝臓の IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞及び NKT 細胞の比率は絶食期間が長くなる毎に増加した。脾臓の IL-2Rβ⁺CD3^{int} 細胞は顕著な変化が認めなかったが、増加傾向を示している。

続いて、CD3⁺αβTCR 細胞を確認するために、抗 CD3 及び B220、αβTCR 及び γδTCR の二重染色で解析を行った(図 3)。その結果、絶食群マウスは対照群と比べ、肝、脾共に経時的に CD3⁺αβTCR 細胞の比率が明らかに増加した。

小腸のリンパ球の phenotype も、絶食の前で検索した(図 4)。この検討の結果では、B 細胞 (B220⁺CD3^{int}) (48.3%→50.7%→57.5%→62.8%)、γδTCR⁺αβTCR⁻細胞 (42.4%→51.9%→53.7%→55.6%)、CD8⁺CD4⁻細胞 (78.4%→83.9%→86.7%→90.1%)、CD8αα細胞 (56.8%→62.1%→68.1%→77.4%) の比率が絶食期間が長くなる毎に増加した。

各臓器の各分画細胞は絶食に対抗能力を比べるために、各臓器の各分画の絶対数を計算した。総単核球は著明な減少を認めたが、肝内 CD3^{int} 及び NKT 細胞絶対数の減少は緩やかであった (data not shown)。

3、細胞内サイトカインの解析

細胞内サイトカインの解析については肝臓 NK、NKT 細胞は絶食 1 日目で IFN-γ 及び IL-4 が増加したものの、2、3 日目では減少を認めた(図 5)。脾臓は肝臓と同様な変化であった (data not shown)。

4、絶食マウス肝臓及び脾臓リンパ球の NK 細胞傷害活性の変化

絶食マウス NK 細胞傷害活性の変化について、YAC-1 及び B6 マウス胸腺細胞を標的細胞として、絶食後 1、2、3 日目で、肝臓及び脾臓リンパ球の NK 細胞傷害活性を測定して、NK 細胞比率あたりの細胞傷害活性を解析した(図 6)。肝臓では絶食 1 日目で YAC-1 (図 6A) 及び B6 胸腺細胞 (図 6B) にて、細胞傷害活性が最大となり、2、3 日目では徐々に低下した。一方、脾臓では、YAC-1 及び B6 マウス胸腺細胞に対する細胞傷害活性が絶食の前後で著明な差を認めなかった。

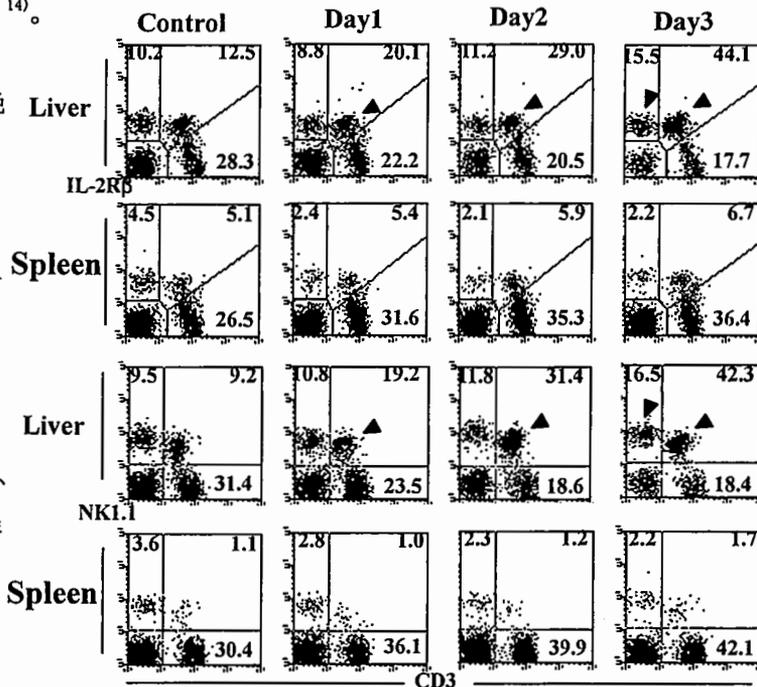


図2. 肝臓、脾臓の単核球をCD3、IL-2Rβ及びNK1.1により二重染色で解析を行った。図中の数値は各サブセットの比率を示す。

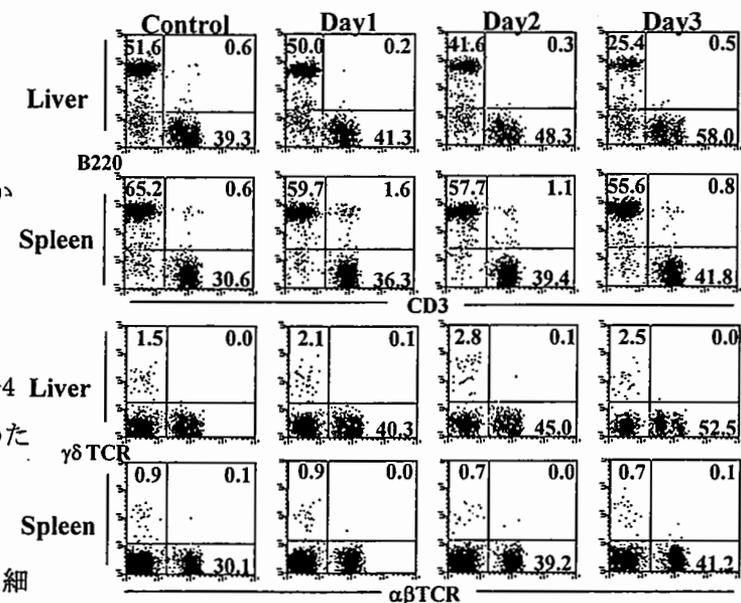


図3. 肝臓、脾臓の単核球をCD3、B220、αβTCR及びγδTCRにより二重染色を解析した。図中の数値は各サブセットの比率を示す。

考察

今回の研究は、絶食マウスのリンパ球による性質と機能の変化について解析した。対照組より、短期絶食マウス肝内NK細胞は、強い細胞傷害活性を有することが明らかになった。絶食により、胸腺の萎縮と、胸腺外分化T細胞であるIL-2Rβ⁺CD3^{int}細胞¹⁵⁾の増加がみられたことから、自然免疫系が活性化されたことによると考えられる。

われわれは、以前の研究において、ストレスが自然免疫系を活性化させ、逆に獲得免疫系の働きを弱めることを報告してきた^{16), 17)}。本研究により、絶食マウスも、このストレス反応に似た反応を示すことがわかった。ストレスは胸腺の萎縮を誘導し、通常のT細胞の分化を抑制し、獲得免疫系を不活性化し、逆に自然免疫系を活性化する¹⁸⁾。ただし、24時間の短期絶食は自然免疫を担うNK、NKT細胞の機能増強を誘導し、自然免疫系を活性化させるとはいえ、それ以上になると細胞数、機能とも低下することが明らかとなった。

従来、絶食は免疫応答低下を引き起こすといわれてきたが、本研究により、絶食時間によっては免疫応答の中でも自然免疫を増強しうることが示唆された。今後、自然免疫を増強する因子及び粘膜免疫を担う小腸のCD8αα⁺B220⁺γδTCR⁺細胞についても検討する予定である。

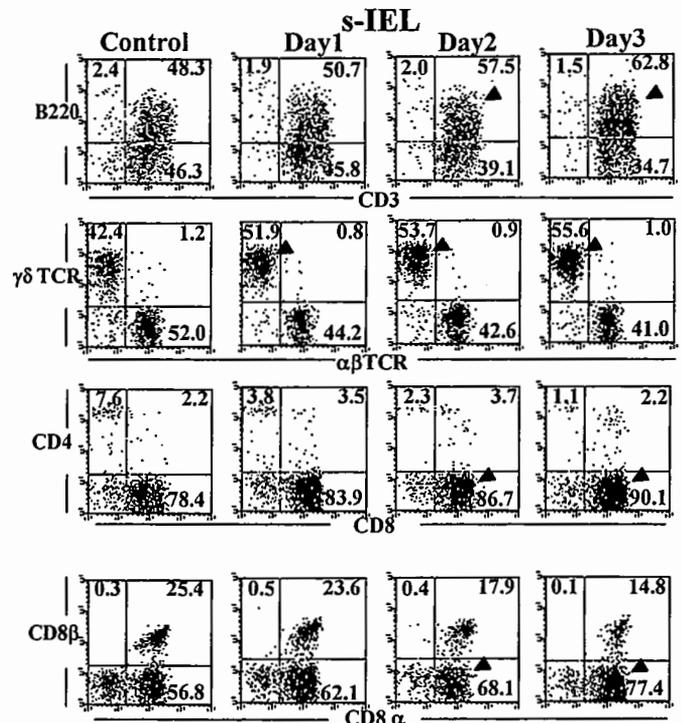


図4. s-IELの単核球の二重染色を示す。

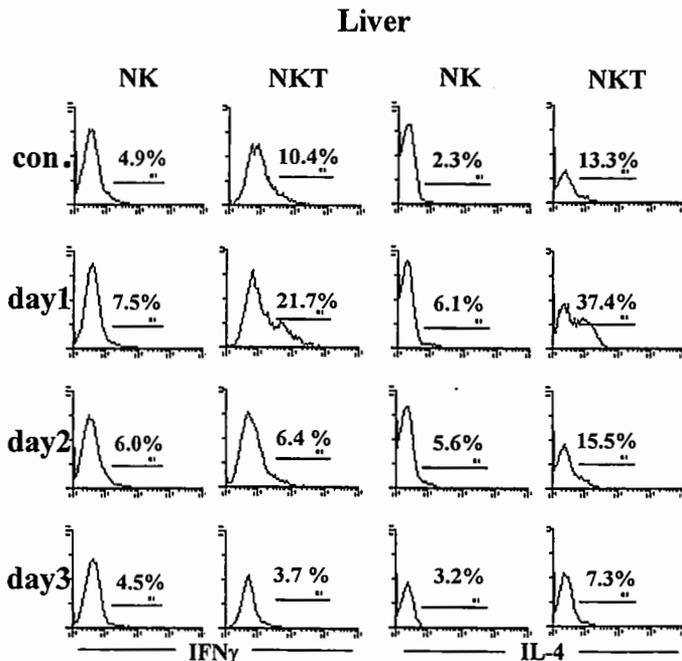


図5. 肝臓細胞内サイトカインの解析を行った。図内の数値は各分画細胞のサイトカインの比率を示す。

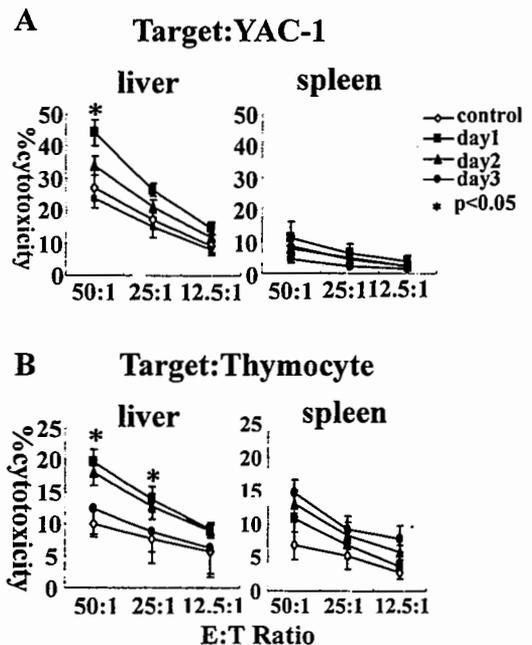


図6. 肝臓及び脾臓内単核球をエフェクターとした。標的細胞は (A) YAC-1 (B) B6胸腺細胞を用いた。

参考文献：

1. Weerasinghe A, Sekikawa H, Watanabe H, Mannoor MK, Morshed SRM, Halder RC, Kawamura T, Kosaka T, Miyaji C, Kawamura H, Seki S and Abo T. Association of intermediate T cell receptor cells, mainly their NK1.1⁺ subset, with protection from malaria. *Cell Immunol* 207:28-35, 2001.
2. Abo T, Kawamura T and Watanabe H. Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev* 174:135-149, 2000.
3. Mannor MK, Weerasinghe A, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T. Resistance to malarial infection is achieved by the cooperation of NK1.1⁺ and NK1.1⁻ subsets of intermediate TCR cells which are constituents of the innate immunity. *Cell Immunol* 211:96-104, 2001.
4. Mannor MK, Halder RC, Morshed SRM, Ariyasinghe A, Bakir HY, Kawamura H, Watanabe H, Sekikawa H and Abo T. Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria. *J Immunol* 169:301-306, 2002.
5. Changchun Li, Xuefeng Bai, Sen Wang, Chikako Tomiyama-Miyaji, Toru Nagura, Toshihiko Kawamura and Toru Abo. Immunopotential of NKT cells by low-protein diet and the suppressive effect on tumor metastasis. *Cellular Immunology* 231: 96-102, 2004.
6. Kawamura H, Kameyama H, Kosaka T, Kuwahara O, Bannai M, Kawamura T, et al. Association of CD8⁺ natural killer T cells in the liver with neonatal tolerance phenomenon. *Transplantation* 73:978-94, 2002.
7. Ishimoto Y, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Yokoyama H, Ebe K, Tsubata S, et al. Age-dependent variation in the proportion and number of intestinal lymphocyte subsets, especially natural killer T cells, double-positive CD4⁺ CD8⁺ cells and B220⁺ T cells, in mice. *Immunology* 113:371-7, 2004.
8. Takahashi S, Kawamura T, Kanda Y, Taniguchi T, Nishizawa T, Iiai T, et al. Activation of CD1d-independent NK1.1⁺ T cells in the large intestine by *Latobacilli*. *Immunol Lett* 102:74-8, 2006.
9. Bakir HY, Tomiyama-Miyaji C, Watanabe H, Nagura T, Kawamura T, Sekikawa H, et al. Reasons why DBA/2 mice are resistant to malarial infection: expansion of CD3^{int}B220⁺γδT cells with double-negative CD4⁺8⁻ phenotype in the liver. *Immunology* 17:127-35, 2006.
10. Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, Iwanaga T, Yoshida Y, Honda S, et al. The primary site of CD4⁺8⁻B220⁺ T cells in *lpr* mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* 160:2665-74, 1998.
11. Tsukada C, Yokoyama H, Miyaji C, Ishimoto Y, Kawamura H, Abo T. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β-glucan. *Cell Immunol* 221:1-5, 2003.
12. Miyaji C, Watanabe H, Miyakawa R, Yokoyama H, Tsukada C, Ishimoto Y, et al. Identification of effector cells for TNFα-mediated cytotoxicity against WEHI164S cells. *Cell Immunol* 216:43-9, 2002.
13. Emoto M, Neuhaus O, Emoto Y, Kaufmann SHE. Influence of β₂-microglobulin expression on gamma interferon secretion and target cell lysis by intraepithelial lymphocytes during intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 64:569-75, 1996.
14. Watanabe T, Kawamura T, Kawamura H, Haga M, Shirai K, Watanabe H, Eguchi S and Abo T. Intermediate TCR cells in mouse lung. Their effector function to induce pneumonitis in mice with autoimmune-like graft-versus-host disease. *J Immunol* 158: 5805-5814, 1997.
15. Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MDK, Morshed SRM and Abo T. Intensive generation of NK1.1- extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic MHC antigens. *Immunology* 102:450-459, 2001.
16. Murayama S, Tsukahara A, Suzuki S, Tada T, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T. Quick recovery in the generation of self-reactive CD4^{low}NKT cells by an alternative intrathymic pathway when restored from acute thymic atrophy. *Clin Exp Immunol* 117:587-595, 1999.
17. Oya H, Kawamura T, Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Minagawa M, Watanabe H, Hatakeyama K and Abo T. The differential effect of stress on NKT and NK cell function. *Clin Exp Immunol* 121:384-390, 2000.
18. Tagoh H, Nishijo H, Uwano T, Kishi H, Ono T and Muraguchi A. Reciprocal IL-1 beta gene expression in medial and lateral hypothalamic areas in SART-stressed mice. *Neurosci Letters* 184:17-20, 1995.

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金—在留中国人研究者—報告書

2007年 3月 1日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 敏 

指導責任者名： 松田 正司 職名： 教授

所属機関名： 愛媛大学大学院医学系研究科
〒791-0295

所在地： 愛媛県東温市志津川

電話： 089-960-5230 内線： 5230

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

二分脊椎モデルにおける運動神経細胞の分化異常の解明

3. 成果の概要 (100字程度)

本研究ではIslet-1陽性運動neuron数の経時的变化および脊髄前角でのIslet-1発現パターンを検討した。二分脊椎では中心管周辺からの幼弱な神経細胞の遊走が遅延していた。また正常ではIslet-1陽性ニューロンは初期に増加し5日にピークに達し、その後減少する。一方、二分脊椎ではこのようなピークは認められず、緩やかな減少を続けていく。このように二分脊椎群において運動神経細胞の発生の進行が正常群よりも遅れ、余分な神経細胞の産生と細胞死が起こらないことが運動神経機能障害を引き起こしていると考えられた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

「第112回 日本解剖学会総会・全国学術集会」

ニワトリ二分脊椎におけるIslet-1陽性運動神経細胞の経時的变化
2007年3月27日

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

愛媛医学

手術的ニワトリ二分脊椎胚モデルにおけるIslet-1陽性運動神経細胞の経時的变化
王敏他

二分脊椎モデルにおける運動神経細胞の分化異常の解明

研究者氏名 王 敏
中国所属機関 泰山医学院
日本研究機関 愛媛大学医学部解剖学発生学分野
指導責任者 教授 松田正司
共同研究者 樺木勝巳、藤原隆、絹谷政江

Abstract

Spina bifida aperta (SBA) is a congenital malformation of spinal cord with complications such as spinal ataxia and bowel and bladder dysfunctions. Our group has developed a post-hatching chick model with surgical-induced SBA showing spinal ataxia. In this model motor neurons in the neural tube were observed by immunohistochemical staining with the monoclonal antibody against Islet-1 as a marker of motor neurons. In this study the delay in migration and maturation of motor neurons were observed in SBA. Although the final numbers of Islet-1 positive neurons in these two groups were not different, the defect in the production and elimination of excess motor neurons in these early developmental stages may be due to the pathological mechanism of the motor complications in this disease.

Key word spina bifida aperta, chick, motor neuron, Islet-1, motor complication

緒言

二分脊椎症は、ヒトでは発生約第4週における神経管の閉鎖不全によって生じる非致死性脊髄先天性奇形の一つである (Copp et al 1990)。二分脊椎症では、脊髄奇形以外にも下肢の麻痺や変形を原因とする歩行障害やその他の身体障害が出生後に顕在化することが知られている。特に、歩行は通常の社会生活を送る上で重要な機能の一つであるが、二分脊椎症患者ではその歩行機能を維持するためだけでも、出生後成人するまでの間に数回の外科的処置を施す必要がある為、二分脊椎症患者の負担となっている。Adzick らによって胎児の奇形脊髄の整復により二分脊椎症に関連した運動機能障害が改善される可能性がヒツジモデル動物を用いた実験で示され、1990年の後半から米国において二分脊椎症の胎児に対して子宮内整復術が行われ始めた。近年になってその手術による効果の検証が始まったが (Bannister, 2000)、この手術が必ずしも当初想定していた「身体障害の顕在化を抑制する」という効果をもたらさないことが次第に明らかにならつつある。これらの事実経過から推測できるように、二分脊椎症に併発する身体障害の病態は十分に解明されているとは言えない。

これまでに二分脊椎症の病態解析のために多くのモデル動物が作られているが、これらのモデルではヒト二分脊椎症患者と異なり致死的な経過をたどることが多くの例で見られる。さらに生存した場合であっても、異常を示さない場合もあるという。近年、Mominoki らは、二足歩行という特性をもつ鳥類胚を用いて歩行障害を示すモデル動物を作成し、このモデル動物の解析結果に加え、「二分脊椎症の胎児では脊髄発生の初期に神経管閉鎖不全が見られること」及び「閉鎖した神経管内で形成される分泌型シグナルタンパク質の濃度勾配が脊髄神経細胞の分化に必須である」ことから、身体障害を引き起こす原因となる神経発生異常が脊髄の初期発生期に二分脊椎胎児で起こっている、との仮説を提示した。そこで、この研究グループの一員である私はこの仮説、すなわち二分脊椎の神経発生異常はすでに初期発生時から起こっていることを明らかにするために、このニワトリモデルにおける奇形領域の運動神経細胞の発生機序を運動神経マーカーであり、ホメオボックス転写調節因子である Islet-1 抗体を用いて明らかにし、二分脊椎症の脊髄における運動神経細胞の発生動態を考察した。

対象と方法

二分脊椎胚の作成: 白色レグホンの有精卵を39.5度で約72時間インキュベートして得たHamburger and Hamilton (1992)のstage 18-19に相当するニワトリ胚に以下の縦木らの方法に従い外科的処置を施し二分脊椎ニワトリ胚を作製した。実体顕微鏡下に卵殻と羊膜を開け、自作のナイフを使用して脊髄背側の蓋板を第6胸椎から尾側に向かい7体節分切開した。

免疫組織化学と細胞数の解析: 各ステージに達したニワトリ胚の第2-4腰椎を切り出し4%パラホルムアルデヒドと0.2%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を用い固定、15 μ mの凍結切片を作成し免疫染色を行った。1次抗体には抗Islet-1抗体を用い、2次抗体にはビオチン化抗マウス抗体を用いABCキット(ベクタスラインABC, ベクタ)を用いジアミノベンチジンにより呈色を行いメチル緑により核染色を行った。Islet-1陽性細胞数を第3腰椎節相当の領域の切片3枚毎に数えた。データは平均値 \pm 標準誤差で示し、群間差は分散分析の後にBonferroniの多重比較法を用いた。

結果

運動神経の発生状態により各ステージを5日まで、6日まで、及び7日以降の3時期に分けて記載するとともに、全時期のIslet-1陽性ニューロン数の変化を検討した。

運動神経の発生初期(4、5日齢胚): この時期までに正常群の脊髄では上衣層と外套層の境界が明瞭となり、両層とも紡錘形をした細胞が密となって存在する。一方、二分脊椎群では、上衣層と外套層の境界は正常群と同様、明瞭であり、両層には紡錘形の細胞が多数存在するが、外套層では細胞間隙が大きく脊髄全体が比較的幼弱な印象を受ける(Fig. 2c, d)。後根神経節は二分脊椎群でも正常群のそれと遜色なく発生するが脊髄の変形に伴って脊髄前角よりもさらに腹側に位置している(Fig. 2c, g)。両群ともに前角と後根神経節にはIslet-1陽性細胞が多く見られるが、後角や中間帯には陽性反応が無い。前角の位置は両群とも腹外側部にあるが正常群の前角は境界が明瞭であるが(Fig. 2b, f)二分脊椎群では変形し、その境界も明瞭でない(Fig. 2d, h)。上衣層から前角領域に移動中のIslet-1陽性細胞は4日齢胚で両群とも神経管側に多数認められる(Fig. 2b, f)。5日になると正常群の上衣層と前角領域間の陽性細胞数は減少する(Fig. 2f)が、二分脊椎群では神経管付近からの遊走が続く(Fig. 2h)。その結果、正常では前角領域のIslet-1陽性細胞は比較的均一な染色像を示し整然と並んでいる(Fig. 2f)が二分脊椎群では前角領域の細胞シグナルの濃さも不均一で細胞の方向も不規則な状態を示すことになる(Fig. 2h)。

運動神経の発生中期(5.5、6日): 5.5日には正常群では上衣層と前角間の移動細胞はかなり少数となる(Fig. 3b)が二分脊椎ではより多くの細胞移動が続く(Fig. 3d)。この時期二分脊椎では個体により像が多少異なるが、前角は二種類の細胞集団に区分されることが多い。すなわち外側に強いシグナルを示すIslet-1陽性細胞が、内側には比較的弱いシグナルを示す細胞が位置している(Fig. 3d)。一方6日になると両群ともに移動細胞は少なくなり、同じような像を呈する。そして両群とも前角の運動神経は外側のIslet-1陰性ニューロンと内側のIslet-1陽性ニューロンとに分かれ、その境界は明瞭である(Fig. 3f, h)。

運動神経の発生後期(7、8、9日): 7日になると前角が発達し正常では外側に(Fig. 4a, b)、二分脊椎では腹側に前角が張り出してくる(Fig. 4c, d)。前角の内部も内側にIslet-1陽性細胞が集合し、正常ではその外側に(Fig. 4b)、二分脊椎では腹側にIslet-1陰性細胞が集合する(Fig. 4d)。

9日になると、正常ではIslet-1陽性細胞はほとんど見られなくなり(Fig. 4f)、二分脊椎では背側に少数のIslet-1陽性細胞が認められるのみとなる(Fig. 4h)。その代わりに細胞質がIslet-1弱陽性である運動ニューロンが前角を占めるようになる。同時に9日以降の運動ニューロンはIslet-1では追跡出来ないことも判明した。

全時期のIslet-1陽性ニューロン数の変化: 正常ではIslet-1陽性ニューロンは初期に増加し5日にピークに達し、その後減少する(Melting et al 1993)。一方、二分脊椎ではこのようなピークは認められず、緩やかな減少を続けていく(Fig. 5)。発生初期と8日を見ると両群にはほとんど違いが無いように見

えるが、5日前後における正常脊髄での急激な Islet-1 陽性ニューロンの増減は重要な所見である (Fig. 5)。

考察

本研究において正常群の Islet-1 陽性細胞数は一過性に増加し、その後、徐々に減少していったが、二分脊椎群ではこのような一過性の細胞数の増加が見られずに減少していった。通常、正常発生胚の神経系の発生では細胞の過剰増殖とそれに続くアポトーシスによって標的を支配できない細胞が排除されることが知られている。このような発生過程がどの程度神経回路網の構築に寄与しているかは、不明な点が多い。しかし、本研究で明らかになった正常群と二分脊椎群との間でみられた神経細胞動態の違いは、Mominoki ら (2006) が提示している二分脊椎症状態を呈する脊髄領域において神経細胞の初期発生異常が起これ、これが歩行障害の原因となるという仮説を支持している結果であると思われる。

近年、脊髄神経細胞、特に運動神経細胞に関する神経細胞種の決定化プロセスについて数多くの知見が蓄積されつつある。その一つに Lim ホメオボックス遺伝子群を中心に運動神経細胞の特性獲得や特異的な軸索伸張過程等のプロセスが明らかにされ、現在では、これらの遺伝子発現産物を追跡することにより運動神経細胞における特定の細胞集団そのものの同定やその分化プロセスを把握することが可能となっている。すなわち、ニワトリ胚の腰髄の運動神経細胞は、体幹骨格筋群を支配する運動神経細胞で構成された内側運動神経柱 (MMC) と四肢の骨格筋を支配する運動神経細胞で構成された外側運動神経柱 (LMC) に区分される。さらに LMC は背側の骨格筋を支配する神経細胞で構成された外側 LMC (LMC1) と腹側の骨格筋を支配する神経細胞で構成された内側 LMC (LMCm) に区分される。これらは Lim ホメオボックス遺伝子産物を追跡することによって区分できる。

これまでに、正常発生したニワトリ胚の腰髄部での運動神経細胞数の変化について詳細に報告されている。腰部脊髄の神経前駆細胞は本研究で手術を行った St18-19 に作られ、約 95%以上の運動神経前駆細胞が St25 (E4.5) までに作られる。一方、細胞排除機構であるアポトーシスは St25-27 (E5-5.5) 頃から腰部脊髄領域で始まり、St29-30 (E6) でピークを迎え、St38 (E12) までに終息するという。したがって、正常発生胚の腰髄の運動神経細胞は E5.5-E6 まで細胞数が増加し、細胞数のピークを迎え、その後、減少に転じ、E12 以降一定数を維持することが報告されている。

今後、本研究で用いた二分脊椎症モデル動物における脊髄神経細胞、特に運動神経細胞の正確な動態を数種類の Lim ホメオボックス転写調節因子を組み合わせて追跡し、二分脊椎症に関連した各種身体障害の発生メカニズムを解明する研究を行いたいと考えている。

文献

1. Copp AJ, Brook FA, Estibeiro JP et al: The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 363-403
2. Adzick NS, Sutton LN, Crombleholme TM et al: Successful fetal surgery for spina bifida. *Lancet* 1998; 352:1675-6
3. Bannister CM: The case for and against intrauterine surgery for myelomeningocele. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:109-13
4. Mominoki K, Kinutani M, Wakisaka H et al: Leg dysfunctions in a hatched chick model of spina bifida aperta. *Expe Neurol* 2006; 197:133-42
5. Kinutani M, Coltey M, Le Douarin NM: Postnatal development of a demyelinating disease in avian spinal cord chimeras. *Cell* 1986; 45:307-14
6. Meltling C, Camu W, Henderson CE: Embryonic wing and leg motoneurons have intrinsically different survival properties. *Development* 1993; 118:1149-56

付図



Fig.1: Photographs of the normal chick (a) and the chicks with lesions of a length measuring 5 (b) and 7 somite (c). (photographs courtesy of Dr. K. Mominoki)

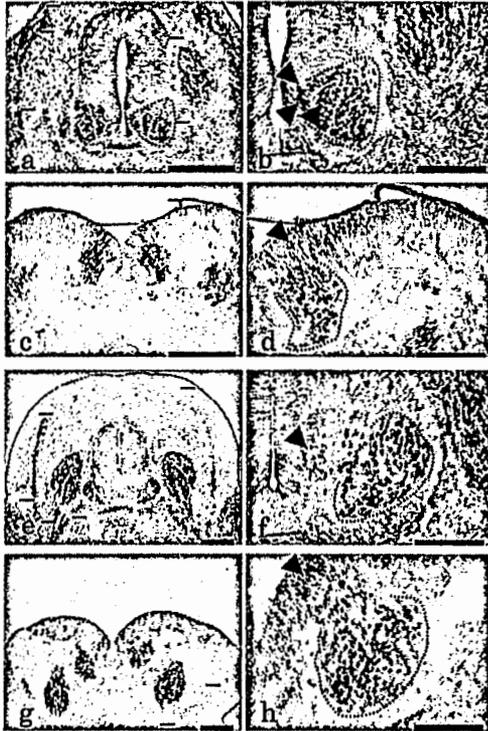


Fig.2: Distribution of Islet-1 positive neurons in neural tube at E4 and E5.

a-d: photomicrographs of transverse section through L3 neural tube in control (a, b) and SBA (c, d) at E4.

e-h: photomicrographs of transverse section through L3 spinal cord in control (e, f) and SBA (g, h) at E5. (Figs. b, d, f and h are the high magnification photomicrographs of left ventral horn in Figs. a, c, e and g respectively.)

Islet-1 is visible in the whole ventral horn and DRG. There is little amount of Islet-1 positive neurons in the dorsal horn and the area around roof plate. The arrows indicate the immature Islet-1 positive neurons migrating from the ependymal layer to the ventral horn.

S=skin; D=dermatome; M=myotome; VR=ventral root; DR=dorsal root; VH=ventral horn; DH=dorsal horn; AM=amnion membrane.

Scale bars =200 μ m(a, c, e, g), 100 μ m(b, d, f, h).



Fig.3: Distribution of Islet-1 positive neurons in ventral horn at E5.5 and E6.

a-d: photomicrographs of transverse section through L3 spinal cord in control (a, b) and SBA (c, d) at E5.5.

e-h: photomicrographs of transverse section through L3 spinal cord in control (e, f) and SBA (g, h) at E6. (Figs. b, d, f and h are the High magnification of photomicrographs of left ventral horn of Figs. a, c, e, and g respectively.)

At E5.5(a-d), Islet-1 positive neurons exist throughout the ventral horn, but exist only in LMCm at E6(e-h). The arrows indicate the immature Islet-1 positive neurons migrating from ependymal layer to the ventral horn. VH=ventral horn; LMCi=lateral part of lateral motor column; LMCm=medial part of lateral motor column.

Scale bars =200 μ m(a,c,e,g),100 μ m(b,d,f,h).

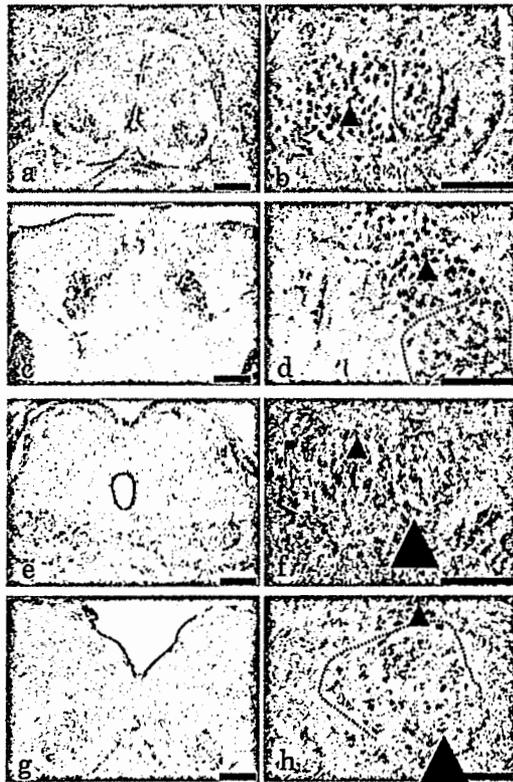


Fig4: Distribution of Islet-1 positive neurons in ventral horn at E7 and E9.

a-d: photomicrographs of transverse section through L3 spinal cord in control (a, b) and SBA (a, d) group at E7.

e-h: photomicrographs of transverse section through L3 spinal cord in control (e, f) and SBA (g, h) at E9. (Figs. b, d, f and h are the high magnification of photomicrographs of left ventral horn of Figs. a, c, e, and g respectively.)

The arrows indicate Islet-1 positive nuclei. The arrowheads in Figs. f and h shows the Islet-1 positive cytoplasm. Some Islet-1 positive cells inside the lines in Figs. b, d and h present weak Islet-1 signals in the nuclei. Scale bars =200 μ m(a, c, e, g),100 μ m(b, d, f, h).

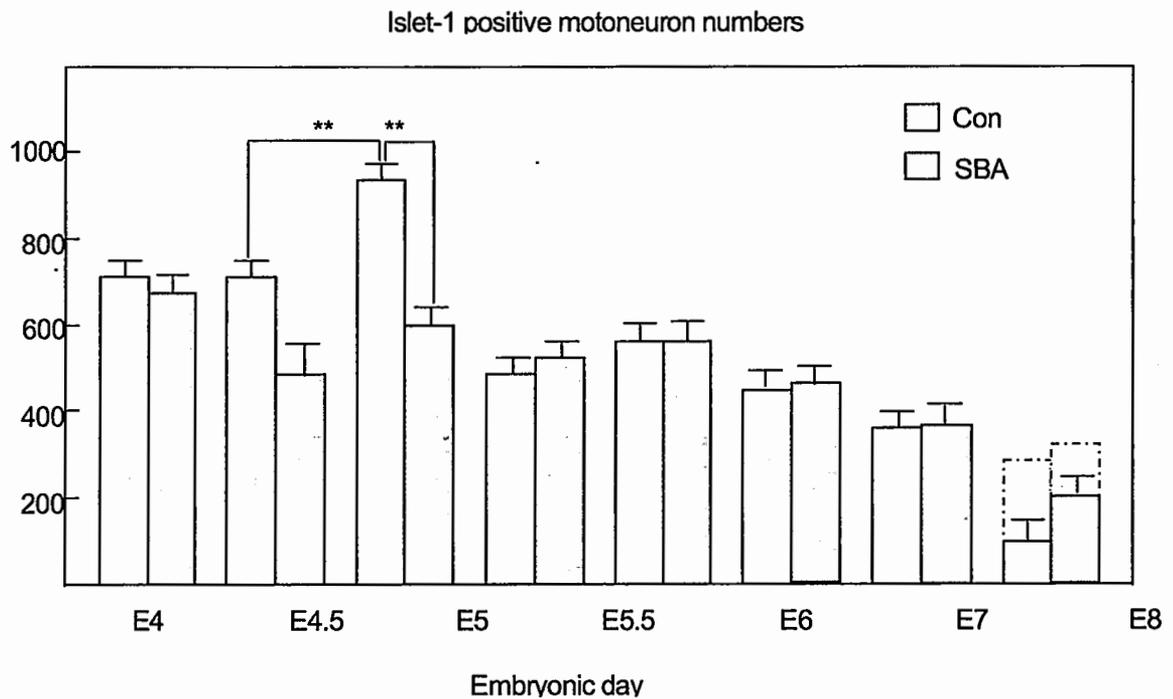


Fig.5: Chronological changes in the number of Islet-1 positive neurons in L3 ventral horn from E4 to E9 of control (gray) and SBA (black). ** $P < 0.01$: significantly different from the former stage and the control of the same stage.

血管平滑筋細胞におけるアンジオテンシン II とアルドステロンのクロストークによる血管老化の促進作用についての検討

研究者氏名	関莉娟
日本研究機関	愛媛大学 分子心血管生物・薬理学
指導責任者	教授 堀内正嗣
共同研究者	岩井 将, 茂木正樹

要旨

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAS)の血管老化与える影響について検討した。ラットの胸部大動脈より調整した血管平滑筋細胞を用い、老化関連 β ガラクトシダーゼ染色にて細胞老化を評価し、細胞内シグナルの発現についてウエスタンブロットで検討した。酸化ストレスについては dihydroethidium によるスーパーオキシドアニオンの産生で評価した。Ang II (10^{-7} M) 連日刺激 5 日後より、老化 VSMC が増強した。老化細胞は選択的 AT₁ 受容体ブロッカー(ARB)のバルサルタンの投与により減少したが、ミネラルコルチコイド拮抗薬のスピロラクトン処置でも軽度減少した。Ang II 刺激により VSMC から Aldo 分泌も認め、Aldo 単独でも老化が促進された。このメカニズムには Ki-ras2A の増加や酸化ストレスの増強が関与していた。さらに、それぞれ単独の濃度で影響しない低濃度の Ang II (10^{-9} M)と Aldo (10^{-12} M)の両者の併用で、老化特異的染色細胞数の有意な増加が認められ、Ki-ras2A の発現や酸化ストレス、NADPH オキシダーゼ活性の相乗的な増加が認められた。以上から血管老化に RAS の相互作用が関与していることが示唆された。

Key Words アンジオテンシン II, アルドステロン, 血管平滑筋細胞, 老化, 酸化ストレス

緒言

近年、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAS)は血管の老化に影響を与え、動脈硬化の発症に深く関与することが示唆されている。我々はこれまでにアルドステロン(Aldo)とアンジオテンシン(Ang) II が血管平滑筋細胞(VSMC)の増殖において相乗的に関与していることを報告した。このメカニズムに Ras ファミリーの一つである Ki-ras2A の増加が関連しており、Ki-ras2A は老化にも影響することから、Aldo と Ang II が VSMC の血管の老化にも影響しているのではと考えた。そこで、VSMC の老化における Aldo と Ang II の相互作用について検討した。

対照と方法

Sprague-Dawley ラットの胸部大動脈より調整した血管平滑筋細胞を用い、細胞の老化は、老化関連 β ガラクトシダーゼ(SA- β -gal)染色を行い評価し、p53、p21、p16、p27 などのサイクリン依存性キナーゼ(CDKI)の発現の増大や増殖シグナルに対する反応性の低下なども老化の指標として検討した。また細胞内シグナルの発現についてはウエスタンブロットで検討し、より詳しい検討には siRNA による遺伝子ノックダウン法も用いた。酸化ストレスについては dihydroethidium によるスーパーオキシドアニオンの産生で評価した。

結果

VSMC は連日の Ang II (10^{-7} M) 刺激により細胞数は初めの 5 日間は増加を認めたが、その後はプラトーとなり、SA- β -gal 染色の陽性細胞数の割合は Ang II 刺激 5 日後より増強した(図 1 参照)。これらの老化の指標は選択的

AT₁ 受容体ブロッカー (ARB) のバルサルタン の投与によりほぼ完全に抑制されたが、ミネラルコルチコイド拮抗薬のスピロラクトン処置でも部分的に抑制された。また、老化特異的染色細胞が増加するのに伴って、CDKI の発現の増加や増殖因子刺激による反応性の低下も同様に認められた。スピロラクトン処置により VSMC の老化細胞数が部分的に抑制されたことから、Aldo の関与も示唆されたため、Ang II 刺激により VSMC からの Aldo 分泌について検討したところ、Aldo が時間依存的に増加し、VSMC からアルドステロンが分泌されていることがわかった。そこで VSMC に分泌濃度の Aldo を単独で投与したところやはり老化が促進された。このことから、Ang II (10⁻⁷ M) 刺激により、Ang II だけでなく、分泌される Aldo によっても VSMC の老化が相加的に促進されることが示唆された。この詳しいメカニズムについて検討すると、Ang II 又は Aldo 刺激により Ki-ras2A の発現は時間依存的に増加し、Ki-ras2A-siRNA を用いて Ki-ras2A 遺伝子をノックダウンすると Ang II 刺激による老化の指標は有意に抑制されたことから Ki-ras2A タンパクの増加の影響が考えられた。また、Ang II 又は Aldo 刺激により酸化ストレスや NADPH オキシダーゼ活性の増加を認めたことから、抗酸化剤であるスーパーオキシドデスムターゼ (SOD) や N-アセチルシステイン (NAC)、Rotenone、Antimycin-A を添加したところ、老化特異的染色細胞数と Ki-ras2A の発現の部分的な減弱が認められた。

さらに、それぞれ単独の濃度では、頻回刺激しても細胞老化は来さない低濃度の Ang II (10⁻⁹ M) と Aldo (10⁻¹² M) の両者を同時に添加して VSMC を刺激したところ、老化特異的染色細胞数の有意な増加が認められた (図 2 参照)。また、CDKI の発現の増加や増殖因子刺激による反応性の低下も同様に認められた。そのメカニズムについて検討したところ、Ki-ras2A の発現や酸化ストレス、NADPH オキシダーゼ活性においても相乗的な増加が認められた。

考察

以上より RAS による VSMC の老化促進のメカニズムには、AT₁ 受容体を介した Ki-ras2A の発現の上昇や酸化ストレスの亢進が関与しており、分泌される Aldo も関与していることが示唆された。さらに老化に影響しない Ang II と Aldo でも両者が共存することで、低濃度であっても相乗的に老化を促進する可能性が考えられた。故に Ang II と Aldo の効果的な抑制は血管の老化の予防に重要であると考えられた。今後、増殖因子である RAS がなぜ老化を誘導するのかについて Ki-ras2A の下流である ERK やその他の MAP キナーゼ系に注目して検討を行っていく予定である。また、アンジオテンシン受容体 (AT₁、AT₂ 受容体) からのシグナルと血管老化についての詳しい検討もノックアウトマウスから調整した VSMC を用いて検討する予定である。

参考文献

Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Induce Mitogenic Response in Vascular Smooth Muscle Cells. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Circ Res. 97:434-442 (2005)

注：本研究は『The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension』ならびに『60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease』にて、ポスター発表された。
また、現在『Cardiovascular Research』に論文投稿中である。

作成日：2007年3月10日

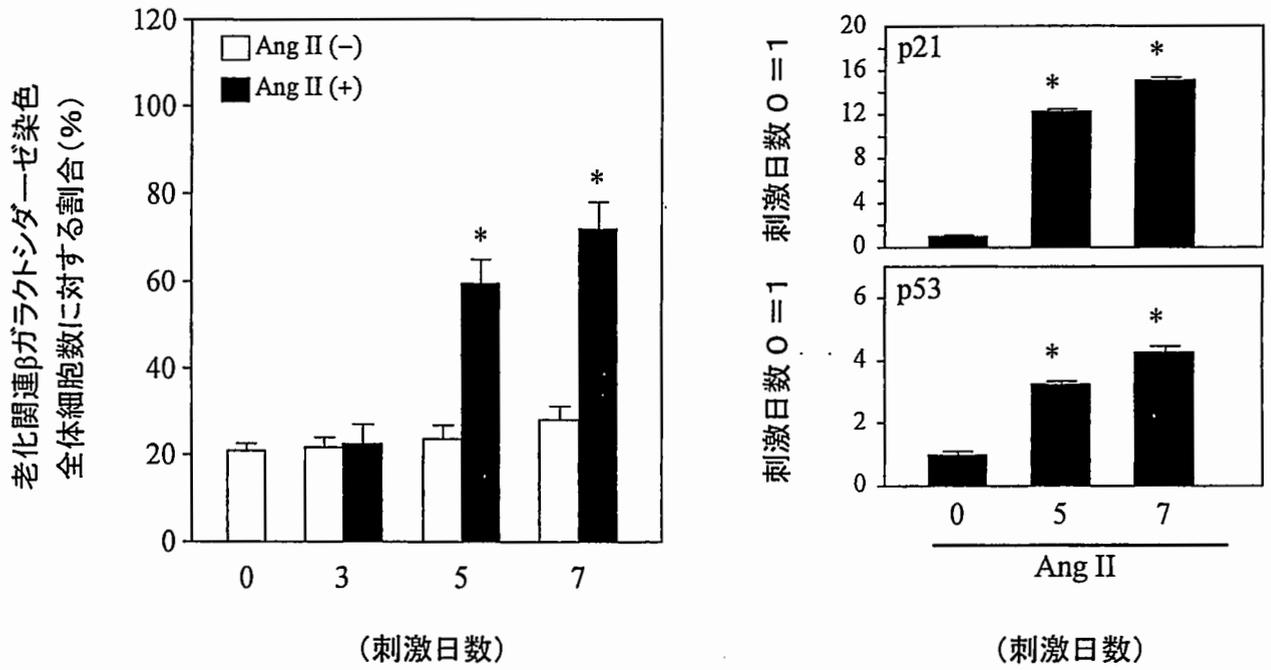


図1. アンジオテンシンII 刺激による老化細胞数の割合とサイクリン依存性キナーゼの発現の増加

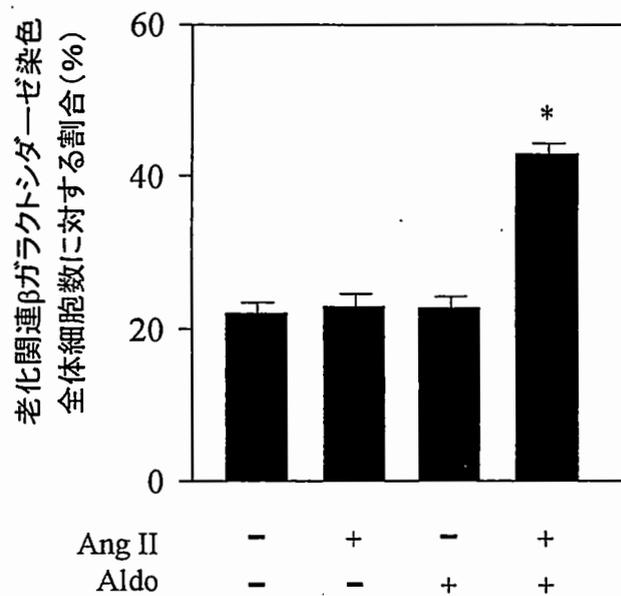


図2. 低濃度アンジオテンシンII とアルドステロン刺激による老化細胞数の割合の相乗的増加効果

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 王 勇 

指導責任者名： 山本清二 職名： 助教授

所属機関名： 浜松医科大学

〒431-3192

所在地： 静岡県浜松市半田山 1-20-1

電話： 053-435-2392 内線： 2392

1. 助成金額： 60 万 円

2. 研究テーマ

ラット脳梗塞モデルの脳障害に果たす活性酸素の役割 生体イメージングによる病態解析

3. 成果の概要（100字程度）

1. イメージングに適する4血管閉塞による前脳虚血モデルの作成することを成功した。2. レーザードップラー法で、4血管閉塞により大脳皮質脳血流の経時変化の測定も成功した。3. MCBL (multicell bolus loading) 法で色素をラットの脳表ある部位にin vivoロードすることが成功した。4. Closed cranial window作成法も確立した。5. 上記のモデルを用い、活性酸素産生の指標となる蛍光色素による生体内蛍光イメージングを行い活性酸素の産生を可視化することもできた。6. 脳血流低下の程度、活性酸素の発生量および時間経過を検討することもできた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

1. 生体内カルシウムイメージングにより観察したラット一過性前脳虚血後の脳内カルシウム反応は海馬CA1領域と大脳皮質で異なる。山本清二、王勇、茨木京子、宮川厚夫、櫻井孝司、寺川進。第29回日本神経科学大会。2006年7月21日（京都）

2. ラット一過性前脳虚血によるin situカルシウム反応からみた海馬CA1領域とCA3領域の差異。山本清二、王勇、櫻井孝司、寺川進。第18回に本能循環代謝学会総会。2006年11月10日（東京）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

1. T.Sakurai, S. Yamamoto, A. Miyakawa, T.O. Yoshida, E. Kohno, R. Tsuchiya-Susuki, Y. Wang, H. Hirukawa, S. Terakawa. Fiber-coupled confocal microscope (FCM) for real time imaging of cellular signals in vivo. Proc SPIE. 6088:31-36, 2006.

2. Yong Wang, Seiji Yamamoto, Kyoko Ibaraki, Atsuo Miyakawa, Takashi Sakurai and Susumu Terakawa. Free radical production in rat ischemic brain measured by intravital fluorescence imaging. Neurotrama Research. 17:24-28, 2005.

3. Kyoko Ibaraki, Seiji Yamamoto, Yong Wang, and Susumu Terakawa. Morphological changes of hippocampal neurons in AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) - mediated excitotoxicity. Neurotrama Research. 17:29-33, 2005.

ラット脳梗塞モデルの脳障害に果たす活性酸素の役割

— 生体イメージングによる病態解析 —

研究者氏名	王 勇
中国所属機関	中国医科大学脳神経外科
日本研究機関	浜松医科大学光量子医学研究センター
指導責任者	助教授 山本清二

要 旨

活性酸素は、虚血性神経細胞死の病態に重要な役割を果たしていると考えられている。培養細胞では活性酸素の産生をイメージ化することは可能であるが、個体レベルでは未だ困難である。脳には神経細胞だけでなく、グリア・血管・血流が存在し、虚血性神経細胞死の病態を研究する場合、個体レベルでの検討が必要である。本研究では、生体内蛍光リアルタイムイメージング法により、ラット脳虚血時の脳内活性酸素である $\text{O}_2^{\cdot -}$ と $\text{OH}\cdot$ の産生を解析し、個体レベルで評価するシステムを構築することを目指す。

Key words 脳虚血 活性酸素 生体イメージング

緒 言

【研究の背景】

中枢における病態と活性酸素との関わりとして、酸化的ストレスをはじめ、脳出血や脳梗塞による脳浮腫、脳実質の壊死および老化などの諸問題が検討されている。特に酸化的ストレスを受けやすい病態として、虚血-再灌流障害がある。虚血-再灌流時には反応性の高い活性酸素 ($\text{O}_2^{\cdot -}$, $\cdot\text{OH}$, など) が発生して、虚血性神経細胞死の原因の一つと考えられている。活性酸素が脳梗塞の神経細胞傷害に関与するかどうかは、現在まで活性酸素消去酵素により脳梗塞巣が縮小するという間接所見に留まり、解明は未だに不十分である。さらに、活性酸素は反応性高く短命であるために、生体内での直接検出やその動態を把握することが困難であり、今までの個体レベルでの脳虚血と活性酸素の研究は極めて稀である。活性酸素はその測定が困難である上、生体内でのイメージングは未だに成功していないが、基礎から臨床へのトランスレーショナルリサーチに必要な個体レベルでの実験を行う必要がある。

【解決すべき点と研究目的】

従来採用されている測定方法は、ほとんど活性酸素の過酸化反応産物による間接的な測定方法である。これらは生体で発生した活性酸素を直接測定したものではなく、そのいずれもラジカル種・発生部位の決定、定量性などに関して何らかの問題を有している。また脳組織について直接的な方法で活性酸素を *in vivo* 測定した報告もない。

それにより、活性酸素をターゲットにした薬剤や治療法の直接的な評価が可能になる。そこで本研究では以下を目的とする。①光学顕微鏡の下にラットを置いて、脳血管閉塞前後にわたり継続して観察できるラット脳梗塞モデルを作製する。②上記のモデルを用い、活性酸素産生の指標となる蛍光色素による生体内蛍光イメージングを行い活性酸素の産生を可視化する。③脳血流低下の程度、活性酸素の発生量および時間経過などを検討する。

研究方法

虚血モデル：Adult SD rat (300 g) を全身麻酔し、自発呼吸下に、まず両側の椎骨動脈を凝固閉塞し、その後両側総頸動脈を Balloon Occluder で閉塞して、4 血管閉塞による一過性前脳虚血モデルを作る (図 1)。レーザードップラー法でこのモデルの脳血流変化を測定する。測定時間虚血 10 分間、再灌流 20 分間 (図 2)。測定部位 (bregma 点より後 3.6mm、右よこ 3.5mm)。

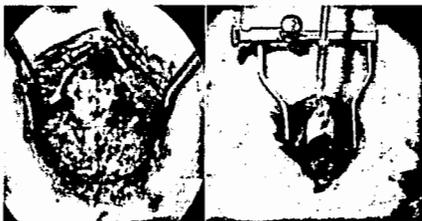


図1. 左: 両側の椎骨動脈を凝固閉塞;
右: Balloon Occluder で総頸動脈を閉塞。

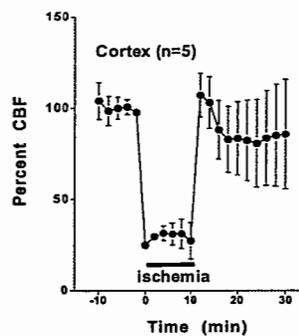


図2. レーザードップラー法で測定した、4 血管閉塞により大脳皮質の脳血流は約 30% まで低下している。

蛍光色素の投与方法：活性酸素のイメージングは $5\mu\text{l}$ の活性酸素指示色素 (MitoSOXTM、HPF) を立体定位脳手術式にマイクロインジェクションすることにより、ラット (8 週齢以降、体重 300g) の脳表 (center 3.6 mm caudal and 2 mm lateral to the Bregma, 1.4 mm depth) 領域に microinjection し (図 3)、共焦点顕微鏡で観察しつつ、虚血前後約 1 時間 (虚血前 5 分、虚血中 10 分、再灌流 40 分) にわたって蛍光強度の変化を検討する。

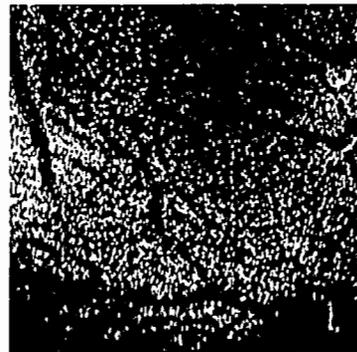


図3左: MCBL 法投与方法; 右: in vivo ラット大脳皮質への MitoSOXTM (Ex/Em 510/580 nm) のロード血管の間にあるニューロンやグリアのミトコンドリアは MitoSOXTM で白く染められた。

観察方法： 3 × 3 mmの closed cranial window を作って、マルチピンホール式共焦点顕微鏡で蛍光像を観察観察しつつ (図 4)、虚血前後約 1 時間 (虚血前 5 分、虚血中 10 分、再灌流 40 分) にわたって蛍光強度の変化を検討する。



図 3. ラットの脳皮質を露出するように骨窓を設け、 closed cranial window を作って観察した。

結 果

虚血前各実験組の動脈血ガス

Blood gases and mean arterial blood pressure in different groups of rats before ischemia (HPF)

Blood gases and mean arterial blood pressure in different groups of rats before ischemia (Mitsox)

HPF	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	MABP(mmHg)	Mitsox	pH	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	MABP(mmHg)
Control n=3	7.395±0.010	50.2±0.1	79.7±1.8	79.3±3.5	Control n=3	7.353±0.012	43.5±2.5	79.7±0.9	77.7±1.5
Ischemia n=5	7.374±0.020	47.1±0.8	72.2±2.2	74.6±3.9	Ischemia n=4	7.375±0.025	47.7±0.9	80.0±3.0	80.3±2.3
Edaravone n=3	7.410±0.004	44.7±3.1	76.7±3.8	73.3±4.3	Edaravone n=4	7.323±0.023	46.1±2.4	79.3±4.5	78.8±3.5

生体イメージングによるコントロール、虚血と虚血前 edaravone 投与各グループの活性酸素の産生の経時測定

MitsoX™ による superoxide 測定各組：再灌流により蛍光強度が虚血前より 180±20%まで上昇していることから、再灌流により superoxide の産生が増加していることが分った。さらに、動脈に近い部位の superoxide の産生はほかの部位より多いことも分かった。(図 1 表 1)。

HPF による hydroxyl radical 測定各組：虚血と再灌流により蛍光強度が虚血前より 190±20%まで上昇していることから、再灌流によりヒドロキシルラジカル hydroxyl radical の産生が増加していることが分った。さらに、動脈に近い部位の hydroxyl radical の産生はほかの部位より多いことも分かった (図 2 表 2)。

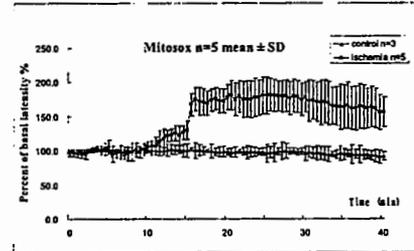
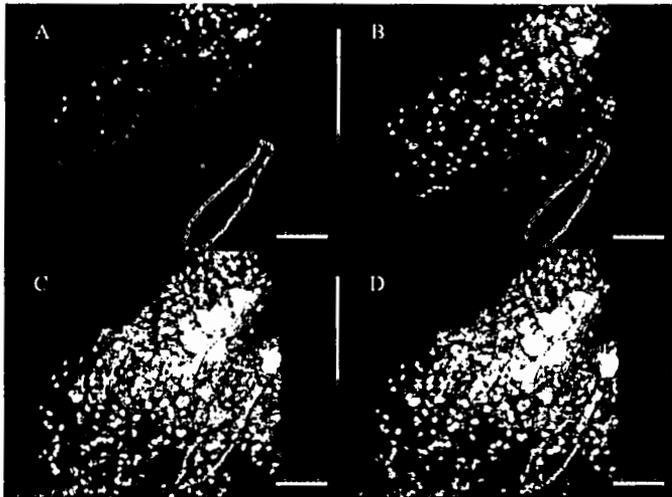


図1表1 A 虚血前 B 虚血5分 C 再灌流2分 D 再灌流10分全視野蛍光強度上昇しており、さらに動脈に近い部位(1,2)は無血管部位(3)や静脈に近い部位(4)より蛍光強度の上昇幅は大きい(data not shown)

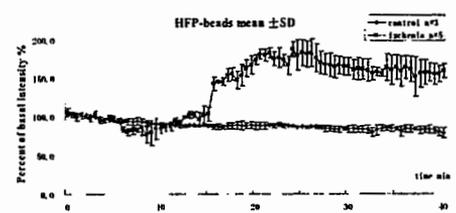
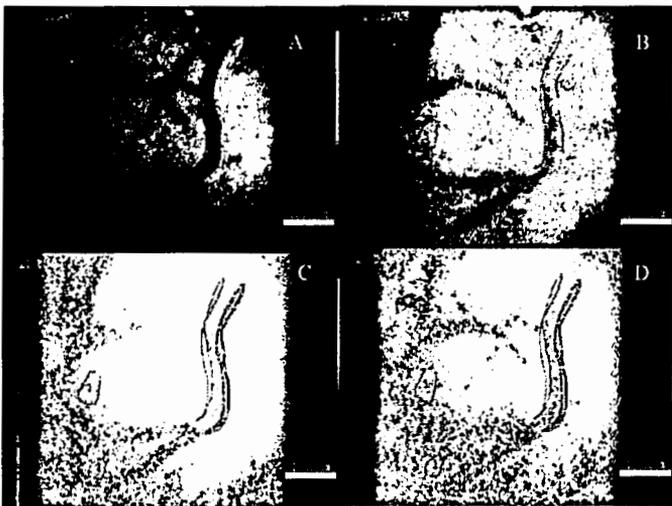


図2表2 A 虚血前 B 虚血7分 C 再灌流6分 D 再灌流13分全視野蛍光強度上昇しており、さらに動脈に近い部位(1,2)は無血管部位(3)や静脈に近い部位(4)より蛍光強度の上昇幅は大きい(data not shown)

結 論

生体内蛍光リアルタイムイメージング法によるフリーラジカルのイメージングを可能にした。30%程度の脳血流低下の虚血と reperfusion により $\cdot O_2^-$ と $\cdot HO$ の産生が増加し、さらに、毒性の高い $\cdot HO$ は毒性の低い $\cdot O_2^-$ より産生の量は多く、またフリーラジカルの産生は部位選択的であることが分かった。

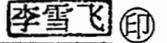
財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 9 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 李雪飞 

指導責任者名： 細井和雄 職名： 教授

所属機関名： 日本徳島大学HBS研究部口腔分子生理学
〒 770-8504

所在地： 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15

電話： 088-633-7324 内線： 5211

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

唾液腺AQP5発現の神経系による調節

3. 成果の概要 (100字程度)

顎下腺を支配する自律神経を切断したラットに、塩酸セビメリンなどの薬を経口投与して、AQP5とAQP1の蛋白質およびmRNAレベルを観察するとともに、リンゾーム酵素の活性を測定した。これらの結果を解析したところ、副交感神経によるAQP5蛋白質発現レベルの調節は転写段階で行われているのではなく、リンゾーム酵素系により制御されていると考えられた。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

「第48回歯科基礎医学会学術大会並びに総会」・ラット唾液腺AQP5、AQP1、及びリンゾーム酵素系に対する自律神経切除及びSNI2011投与の影響

「The 3rd International Symposium on Salivary Gland in Honor of Niels Stensen」・Effects of autonomic denervation and administration of SNI-2011 on the expression of AQPs in the rat salivary gland

「The 1st International Symposium and Workshop "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century"」・Effects of autonomic denervation and administration of muscarinic receptor agonist on the expression of AQPs in the rat submandibular gland

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

「四国歯学会雑誌第20巻、第1号 (2007, 印刷中)」・ラット顎下腺アクアポリン5および1発現に対する自律神経切除および塩酸セビメリン投与の影響

唾液腺 AQP5 発現の神経系による調節

研究者氏名	李雪飞
中国所属機関	大連医科大学付属第二病院外科
日本研究機関	日本徳島大学 HBS 研究部口腔分子生理学
指導責任者	教授 細井 和雄
共同研究者名	カラバシル ミレーバ, プルワンティ ヌヌク, 姚陳娟, 赤松徹也, 金森憲雄

要 旨

【目的】本研究はラット顎下腺における水チャネル、アクアポリン (AQPs) の自律神経系による調節機構を明らかにする目的で行った。【方法】7週齢雄性のSDラットを用い、顎下腺を支配する自律神経である交感神経または副交感神経切除を上頸神経及び鼓索神経を切断することにより行った(それぞれCSTD、CTDとする)。術後15日目から塩酸セビメリン(CM, 10mg/kg体重)、ピロカルピン(PC, 0.3mg/kg体重)クロロキン(CQ, 50mg/kg体重)を連続7日間経口投与した。AQP5とAQP1の蛋白質レベルをウェスタンブロッティングで、又mRNAレベルをノーザンブロッティングとRT-PCR、リアルタイムPCRにより解析した。【結果】CSTDはAQP5及びAQP1蛋白質レベルに大きな影響を与えなかった。CTDはラット顎下腺の重量とAQP5蛋白質レベルを減少させたが、AQP5 mRNAレベルには顕著な影響を与えなかった。CTDラットに対するムスカリンM3アゴニスト、塩酸セビメリンの投与は、低下したAQP5蛋白質含有量を著明に回復させ、AQP1含有量を増加させたが、ピロカルピン投与はこれらに影響を与えなかった。塩酸セビメリン投与はAQP5及びAQP1 mRNAレベルに顕著な影響を示さなかった。CTDはリソゾーム酵素カテプシンB、D、Eの活性を上昇させ、塩酸セビメリンはこの上昇を抑制した。カテプシンB、D、EのmRNAレベルもCTDにより上昇したが、塩酸セビメリンはこの上昇を抑制しなかった。リソゾーム変性剤であるクロロキンの投与によりリソゾームを変性させ、その機能を抑制すると、副交感神経切除により減少したAQP5の発現は回復した。【結論】副交感神経によるAQP5発現レベルの調節は転写レベルによるのではなく、リソゾーム酵素系により制御されていると考えられた。

Key Words : アクアポリン, 自律神経切除, 塩酸セビメリン, カテプシン

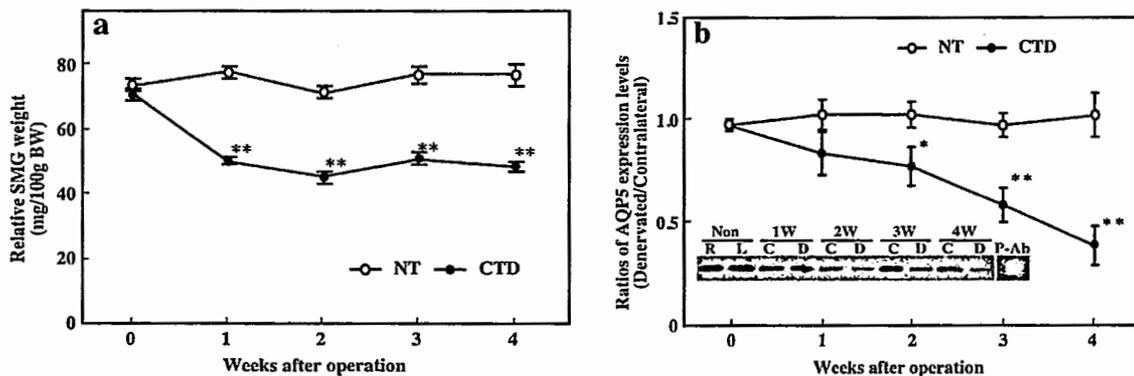
緒言

アクアポリン (AQP) は微生物から動植物まで広く分布する水チャネルで、これにより生体膜を隔てた水移動が浸透圧勾配依存的に行われる。水チャネル AQPs はファミリーを構成し、現在までに 13 種類のメンバーが存在することが知られている。AQPs は細胞膜に存在し、選択的に水、あるいは水とグリセロールや尿素などの小分子を輸送する。AQPs は細胞膜を 6 回貫通しているセルペンチン型膜蛋白質で、分子内のループ B とループ E にファミリー間で良く保存された NPA モチーフがそれぞれ 1 ヶ所ずつ存在する。これらはヘミチャネルを形成し、水はこの部位を通過することが明らかにされている。AQPs の発現・機能のホルモンによる調節については比較的よく研究されている。一方、AQPs の発現に対する自律神経系による調節についてはこれまでほとんど研究されていない。唾液腺は交感神経と副交感神経によって二重支配されている。唾液腺 AQP の発現や細胞内輸送が神経系・神経伝達物質により調節されている可能性が考えられ、これを検証する目的で、本研究に着手した。

対象と方法

動物と処置: 実験には 7 週齢の SD ラットを用い、上頸神経節 (交感神経) 切断、または鼓索神経 (副交感神経) 切断を行った。切断術は実験により、片側または両側に行った。一部の実験では、ピロカルピン (PC, 0.3 mg/kg 体重) および塩酸セビメリン (CM, 10 mg/kg 体重), あるいはクロロキン (CQ, 50 mg/kg 体重) を術後 15 日目から 7 日間、1 日に一回経口投与した。

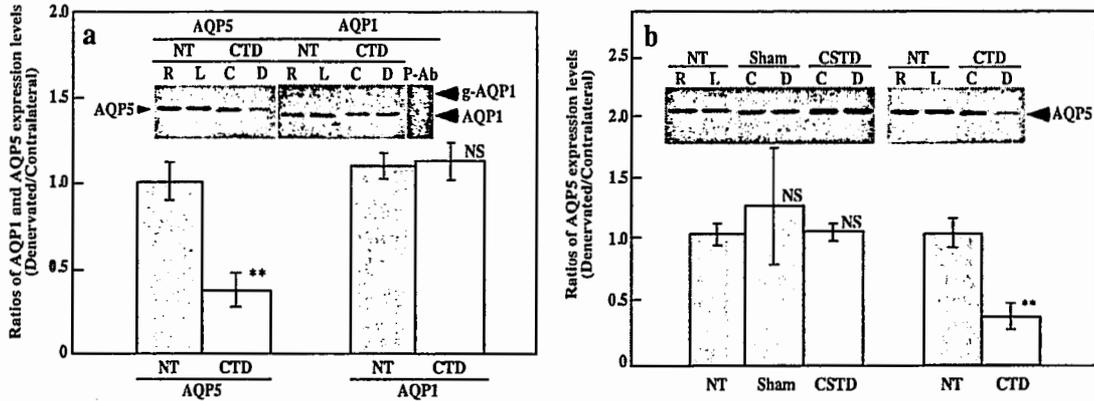
Fig.1



AQPs 発現の解析: AQP1、AQP5 蛋白質発現は当教室の方法により行った。即ち膜分画を調製した後、蛋白定量を Bradford の方法により、また AQPs は教室作成の特異抗体を用いた Western blot 法により行った。AQPs mRNA の定量はディゴキシゲニン標識したプローブを PCR により作成し、Northern blot 法、リアルタイム PCR により行った。

蛋白分解酵素活性の測定: 市販の消光性蛍光基質を使って、正常群、対照群、投与群それぞれのリソゾーム、プロテアソームの酵素活性を測定した。

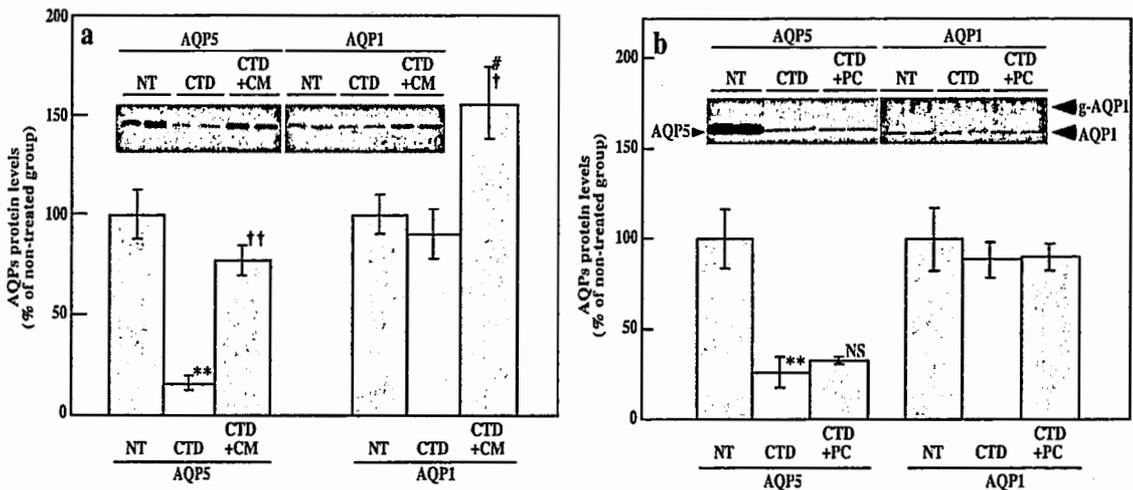
Fig. 2



結果と考察

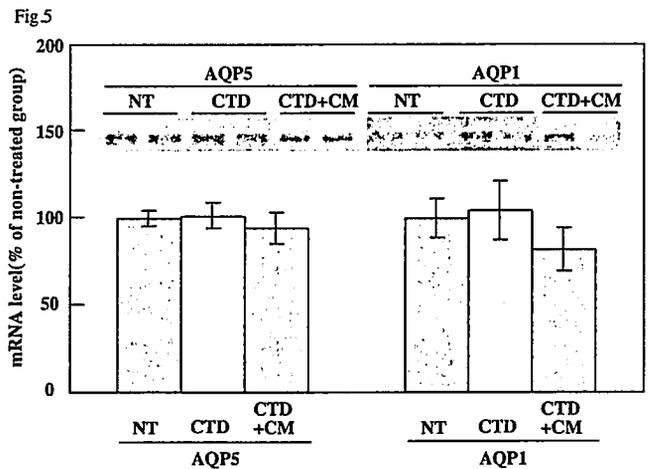
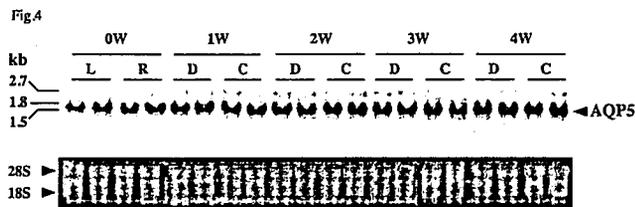
AQP5 および AQP1 蛋白質発現に対する自律神経切断およびムスカリンアゴニスト投与の影響:

Fig. 3



まず、副交感神経（鼓索神経）を切除したラットにおける顎下腺重量と AQP5 蛋白質レベルを解析した。その結果、副交感神経切除（CTD）を行った場合、術側の顎下腺相対重量（腺重量/体重）は直ちに減少し、術後1週以降4週までにおいて対照側の約60%で推移した。この術側と対照側での腺相対重量の違いには有意差が認められた ($p < 0.01$, $n = 5$, Fig. 1a)。また、術側の対照側に対する AQP5 蛋白質レベルの相対率は術後徐々に減少し、対照側 (NT) との有意差 ($p < 0.05$) が術後2週目から認められ、4週目にはこの率は対照側の $37 \pm 9.45\%$ ($p < 0.01$, $n = 5$) にまで減少した (Fig. 1b)。AQP1 発現レベルは術後4週目においても有意に減少しなかった (Fig. 2a)。交

感神経切除 (CSTD) 後 4 週において、顎下腺相対重量 (腺重量/体重) は対照側の約 $81.00 \pm 3.61\%$ ($p < 0.01$, $n=5$) にまで減少したが、AQP5 蛋白質発現レベルに顕著な差が認められなかった (Fig. 2b)。M3 受容体アゴニストである塩酸セビメリンを、1 日 1 回、1 週間経口投与 (10 mg/kg 体重) すると、副交感神経切除によって減少した AQP5 蛋白質発現レベルは有意 ($p < 0.01$, $n=5$) に回復した。また、副交感神経切除による影響が認められなかった AQP1 蛋白質発現レベルは塩酸セビメリン投与により有意に増加した ($p < 0.05$, Fig. 3 a)。ピロカルピンを経口投与 (0.3 mg/kg 体重) しても、副交感神経切除により減少した AQP5 蛋白質発現レベルは回復しなかった (Fig. 3b)。なお、顎下腺重量は塩酸セビメリン投与により増加しなかった。



AQP5 および AQP1 mRNA 発現に対する自律神経切断およびムスカリンアゴニスト投与の影響: ノーザンプロテイングによって検出した AQP5 mRNA に相当する 1.6 kb のバンドの強度は副交感神経切除後の対照側 (R, C) と術側 (L, D) の間で大きな差は認められなかった (Fig. 4)。リアルタイム PCR によって確認された各群 AQP5 mRNA の相対値 (無処置群: NT, 100 とした) は各群間に有意差は認められなかった ($n=5$, Fig. 5)。副交感神経切除 (CTD) による AQP5 蛋白質レベルの減少および塩酸セビメリン (CM) 投与による AQP5 および AQP1 蛋白質レベルの増加は mRNA 発現レベルの変動に起因するのではないことが考えられた。

蛋白質代謝レベルに対する自律神経切断及びムスカリンアゴニスト投与の影響: 以上により副交感神経/M3 アゴニストによる AQP5 蛋白質レベルの変化は転写調節によるものではなく翻訳又は蛋白質代謝レベルによって調節されている可能性が示唆された。そこで蛋白質分解系の酵素に注目し、その活性変化を調べたところ、リソゾーム分解酵素カテプシン D/E の活性が副交感神経切断によって上昇し、この上昇は塩酸セビメリン投与によって抑制された (Fig. 6b)。これらの処置はプロテアソームの酵素活性には顕著な影響を与えなかった (Fig. 6 d)。顎下腺は主として腺房細胞と導管細胞から構成され、AQP5 は腺房細胞に局在する。副交感神経切除および術後塩酸セビ

メルリンを投与したラット顎下腺より Percoll 密度勾配遠心法により導管細胞から腺房細胞を分離し (Fig. 7), 得られた腺房細胞を用いてカテプシン活性を測定した結果, 前述の組織サンプルでの測定結果と同様の傾向が認められた (Table 1)。これらの実験から AQP 蛋白質レベルはリソゾーム系蛋白質代謝酵素によって調節されている可能性が強く示された。この可能性を検証するために、リソゾームを変性させる作用を有すると報告されているクロロキンを投与して、AQP_s 蛋白質レベルを調べたところ、クロロキンは塩酸セビメリンと同様に AQP 5 蛋白質レベルを上昇させた (Fig. 8)。即ちリソゾームの変性により AQP 5 分解が抑制され、AQP 5 レベルが上昇したものと考えられた。

Fig.6

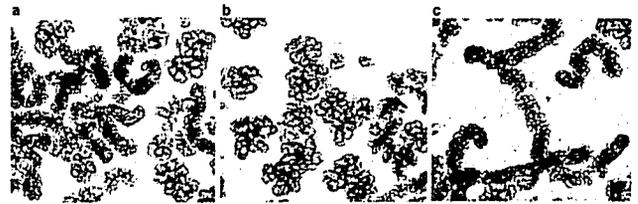
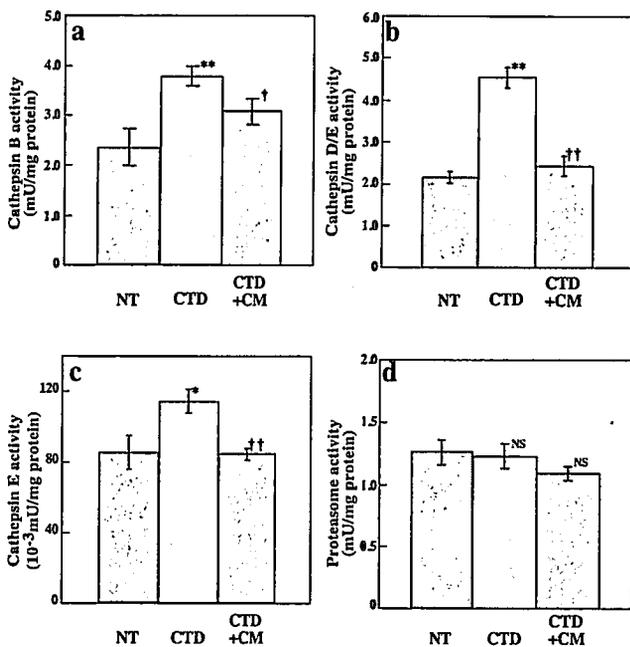


Fig.7 Phase contrast microscopic pictures of rat SMG duct and acinous cells. The SMG was digested by 0.1% collagenase and washed. a: Duct and acini before separation. b: Acini separated by 65% Percoll. c: Duct separated by 65% Percoll.

Fig.8

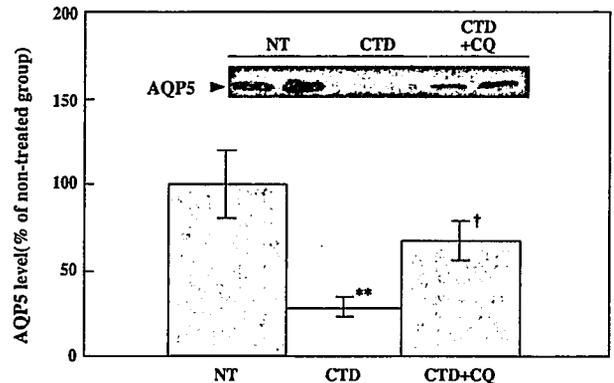


Table 1 Effects of the chorda tympani denervation and SNI-2011 administration on the cathepsin activities of isolated rat acinous cells

	Cathepsin activities (mU/mg protein)			
	D + E (%) ^a	E (%) ^b	D (%) ^c	B (%)
Normal	3.58±0.37(100±10.33)	0.1336±0.0142(100±10.63)	3.44±0.36(100±10.47)	0.0159±0.0024(100±15.09)
CTD	4.61±0.20(128.77±5.59)*	0.0705±0.0094(52.77±7.04)	4.51±0.17(131.10±4.94)*	0.0139±0.0029(87.42±18.24)
CTD+SNI-2011	2.74±0.31(76.54±8.66)**	0.0435±0.0064(32.56±4.79)	2.69±0.30(78.20±8.72)**	0.0211±0.0058(132.70±3.65)

* p<0.05, significantly different from the normal group. **p<0.01, significantly different from the CTD group. c: Calculated by subtracting the value in "b" from those in "a".

結論

顎下腺にある AQP_s の発現レベルに対する副交感神経切除および塩酸セビメリン投与の影響は, mRNA の転写調節によるものではなく, リソゾーム酵素, 主にカテプシン D の活性調節によって制御されている可能性が強いと考えられた。

参考文献

1. Agre P: Molecular physiology of water transport: aquaporin nomenclature workshop: Mammalian aquaporin. Biol Cell 89, 225-257 (1997) (等 48 件文献を引用しましたが、ページ数のために省略させていただきます)

注：本研究は 2006 年 9 月 22 日「第 48 回歯科基礎医学会学術大会並びに総会、鶴見」にてポスター発表、2006 年 10 月 22 日「The 3rd International Symposium on Salivary Gland in Honor of Niels Stensen, Okazaki, Japan」にて口演発表、2007 年 3 月 2 日「The 1st International Symposium and Workshop “The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century”, Awaji, Japan」にてポスター発表、四国歯学会雑誌第 20 巻、第 1 号（2007, 印刷中）に掲載。

作成日：2007 年 3 月 7 日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 鄭 偉 

指導責任者名： 宝金 清博 職名： 教授

所属機関名： 札幌医科大学 脳神経外科
〒060-8543

所在地： 札幌市中央区南1条西16丁目

電話： 011-611-2111 内線： 3351

1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

心肺蘇生後の脳損傷に対する骨髄幹細胞移植の検討

3. 成果の概要（100字程度）

ラット心肺蘇生モデルを作成、蘇生後脳症に対し、ヒト骨髄間葉系幹細胞を経静脈的に移植します。脳海馬CA1領域にアポトーシス細胞の減少、脳代謝Lactate蓄積減輕及びラット運動機能の回復を認められました。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有（学会名・演題）

(2) 発表した論文 無 ・ 有（雑誌名・題名）

心肺蘇生後の脳損傷に対する骨髄幹細胞移植の検討

研究者氏名	鄭 偉
中国所属機関	中国医科大学脳神経外科
日本研究機関	札幌医科大学脳神経外科
指導責任者	教授 宝金 清博
共同研究者	本望 修

要 旨

心肺停止は臨床的に全脳虚血を引き起こす要因の一つである、かつ、非常に高い死亡率を招く。たとえ速やかに蘇生されたにしても、わずか何分間の血流停止は脳虚血敏感部位の神経細胞も変性、壊死、不可逆な神経症状残った。骨髄幹細胞は神経細胞へ誘導分化、再生医療に有用であることが明らかにしてきた。当実験はラット全脳虚血モデルに対し、心肺蘇生後3時間経静脈的に骨髄幹細胞を移植する。心肺蘇生5時間後ラット海馬領域に狙ってMR Spectraを撮られた、術後3日目脳組織を採って、TUNEL染色を行った。Treadmill Stress Testは心肺蘇生前日、術後1日、3日、7日を行った。骨髄幹細胞移植群ラット海馬領域のApoptosis細胞計数はコントロール群より少なくなった、MR SpectraにてLactateも減少した。ラットの運動機能の改善も認められた。

Key Words 心肺蘇生, 骨髄幹細胞, 移植, 神経再生

緒 言:

ラット脳虚血モデルに人骨髄幹細胞を移植し、ラットの梗塞面積の減少及び予後改善することが認められた。適当の条件で、骨髄幹細胞は神経細胞と神経膠質細胞に分化される。当実験はラット心肺蘇生モデルに対し、経静脈的に骨髄細胞を移植し、治療効果を検討する。

対象と方法:

1 骨髄細胞の精製と純化

健康成人ボランティアから人骨髄をインフォームドコンセント後に後腸骨稜より採取。骨髄単核細胞を分離した。150cm²の培養皿に置き、一晚インキュベートした。遊離細胞を洗浄後、接着細胞をMSCBMで培養した。MCGS、4mM L-グルタミンを含み、5%二酸化炭素、37度環境にて浸潤させた。集合後採取したものは、プライマリーMSCとして凍結保存または遺伝子解析に使用した。

2 全脳虚血モデルの作成

LuRH(1)の方法に従って、ラット心肺蘇生モデルを全脳虚血モデルとして採用する。300グラム、雄、Wistarラットを用い、5%イソフル誘導してから1.5%イソフルで全身麻酔、左大腿静脈にルートを確認、肛門温、血圧、心電図など生命をモニタする。筋弛緩剤を注入して、気管挿管、人口換気を与えられる。右総頸静脈から0.5M KCL 0.3mlを右心房に注入、心臓停止させる。7分後0.062mg Adrenalineと25mg NaHCO₃を加え、ラット体内に注入。同時に人工換気を再開、IAC-CPRを行う。自発呼吸が確認してから気管挿管を抜去、cageに戻される。

3 骨髄幹細胞移植

35匹ラットは3組に分けられる。グループ1（正常コントロール群、5匹）は何も処置されない、グループ2（実験コントロール群、15匹）は心肺蘇生3時間後Medium (MSCBM) 1ml 静注し、グループ3（実験群、15匹）は心肺蘇生3時間後 1×10^7 hMSCsを1ml Mediumに加え静注する。

4 画像的評価

7T動物用のMR装置を用い、MR Spectraを撮る。

ラットはケタミン(50mg/kg)とスキルベン(6mg/kg)にて腹腔麻酔され、動物用ホルダに載せ、磁場に入る。頭はImaging Coilの中心部と合わせる。最初はT2強調画像を撮り、海馬の位置を定め、海馬を含め($2 \times 6 \times 3 \text{mm}^3$)のVolume of Interest範囲でMR Spectraを撮る。撮影条件はTR=3000MS, TE=20MS, TM=30MSである。全てのラットは心肺蘇生5時間後MRSを撮る。LactateとCreatineの比の相対値を記録する。

5 TUNEL

骨髄幹細胞移植3日後、ラットは4%Paraformaldehydeで灌流固定後、20 μm の凍結切片を作る。組織切片は37°CにてTdT bufferに30分Incubation後、TdT、biotin-16-dUTP、dATPを含め混合物を37°Cにて1時間Incubation。PBS洗浄後Avidin-biotinylated enzyme complexと反応され、Apoptosis細胞はDABで茶色に着色され、Methylgreenにて対比染色する。Apoptosis細胞数は光学顕微鏡で計数される。

6 Treadmill Stress Test

ラットは一日20分、週二回で角度0及び20m/minの条件でTreadmillで鍛えされる。ラットを電気刺激と放してモーターベルトの上に置き、ベルトの動きの逆方向に走らせる。電気ショックを避けるためにラットは逃げなければならぬ。電動Treadmillで走る最高スピードを記録する。

結果:

MR Spectra 画像分析

実験群とコントロール群ともに心肺蘇生5時間後、海馬領域のMRS画像を撮る。正常コントロール群はCholine、CreatineとNAA三つのピークしか見られない(Fig1a)。心肺蘇生後のラット(実験コントロール群)は上記三つのピークのほか、1.33ppmにLactateのピークが認められた(Fig1b)。骨髄幹細胞移植群もLactateのピークが認められたけれども、高さはコントロール群より低い(Fig1c)。Choline、Creatine、NAA Fig及びLactate各成分の絶対値が測りにくいので、Lac/Cr Ratioは指標として測られる。Fig2は心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群のLac/Cr Ratioで、骨髄幹細胞移植群はコントロール群より著明に下がる。

Apoptosis 細胞計数

心肺蘇生3日後、脳虚血しやすい海馬CA1領域にTargetし、Apoptosis細胞数を測る。正常ラット海馬CA1領域でApoptosis細胞が見られない(Fig3a)、心肺蘇生後のラット(実験コントロール群)海馬CA1領域で殆どApoptosis細胞が占められた(Fig3b)。骨髄幹細胞移植後のラット海馬CA1領域でApoptosis細胞が見られるけれども、実験コントロール群より著明に減少した(Fig3c)。

行動学的評価

心肺蘇生前日、術後1日、3日と7日、4回Treadmill testを施行した。術前各群差別が認められなく、術後1日、3日、7日とも骨髄幹細胞移植群は実験コントロール群より、ラットの走りスピードが上達になった(Fig4)。

考察:

当実験はラット心肺蘇生モデルに対し、人骨髄幹細胞を経静脈的に移植し、著明な治療効果が認められた。

骨髄幹細胞移植の治療機序はいくつかの仮説がある。一つは骨髄幹細胞の神経保護作用。BDNF、GDNF、NGF、

EGF など神経栄養因子は脳虚血範囲の拡大を抑制する報告がある(2,3)。これらの因子は、Antiapoptotic activity、Antiinflammatory activity、Antigliutamate excitotoxicityなどのメカニズムによって、脳虚血部位の機能保存、神経組織修復作用が認められた(4)。骨髄幹細胞はILs、MCSF、Flt-3などを分泌する(5,6)。神経膠質細胞はこれらの因子の刺激によって、BDNF、NGFなどの栄養因子を分泌され、中枢神経系細胞の成長、分化を促す(7,8)。骨髄幹細胞はVEGF、bFGFなどの血管成長因子を分泌する、これらの因子は虚血部位の血管内皮細胞損傷を防ぐ(9)。骨髄幹細胞は細胞免疫反応を抑制し、脳虚血後二次損傷を防ぐ報告も見られる(10,11)。

移植した人骨髄幹細胞は、内源性脳修復機序を促進する可能性もある。GAP-43、Cyclin D1など細胞増殖、分化、形成の標識物は脳虚血部位に発見された(12)。また、Subventricular Zoneの神経幹細胞は骨髄幹細胞移植に従って増加された。

参考文献：

1. Lu HR: Cerebroprotective effects of flunarizine in an experimental rat model of cardiac arrest, *Am J Emerg Med.* 8 (1990) 1-6.
2. Schabitz W.R. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 500-506
3. Ay I, Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents downregulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats, *Mol. Brain Res.* 87 (2001) 71-80.
4. Hirouchi M, Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia, *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120 (2002) 107- 113.
5. Majumdar M.K, Phenotypic and functional comparison of cultures of marrowderived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells, *J. Cell. Physiol.* 176 (1998) 57-66.
6. Eaves C.J, Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures: II. Analysis of positive and negative regulators produced by stromal cells within the adherent layer, *Blood* 78 (1991) 110- 117.
7. Li Y, Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery, *Neurology* 59 (2002) 514-523.
8. Hamano K, Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis, *Cell Transplant* 9 (2000) 439- 443.
9. Bernstein D.C, Suppression of human cytotoxic T lymphocyte responses by adherent peripheral blood leukocytes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 532 (1988) 207- 213.
10. Vassilopoulos G, Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion, *Nature* 422 (2003) 901-904.
11. Wang X, Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes, *Nature* 422 (2003) 897- 901.
12. Li Y, Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats, *Stroke* 29 (1998) 1972-1980.

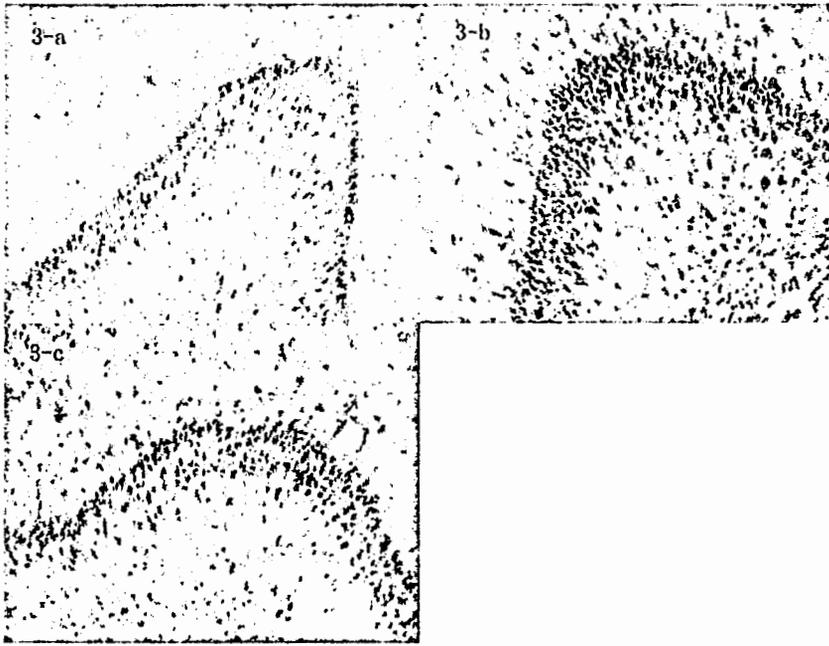


Fig3 Apoptosis 細胞計数。3-a は正常ラット海馬 CA1 領域の画像、3-b は心肺蘇生3日後海馬 CA1 領域の画像、3-c は骨髄幹細胞移植3日後海馬 CA1 領域の画像。

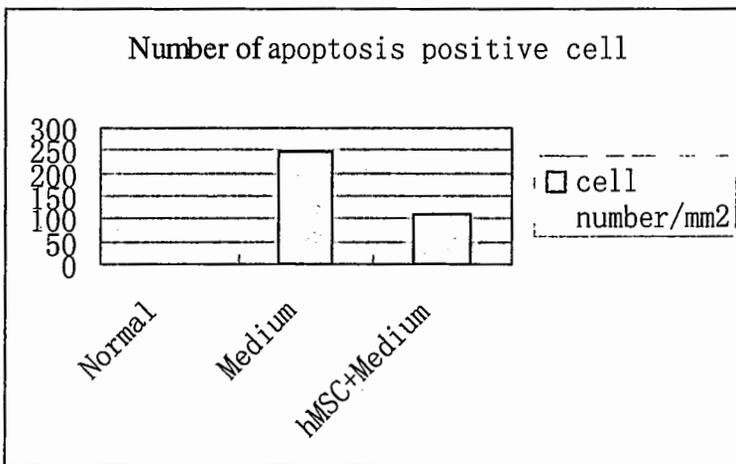


Fig4 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群 Apoptosis 陽性細胞計数の結果

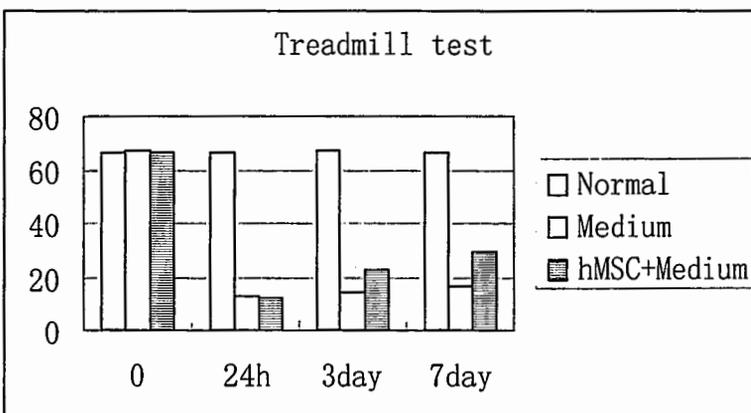


Fig5 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群 Treadmill test の結果

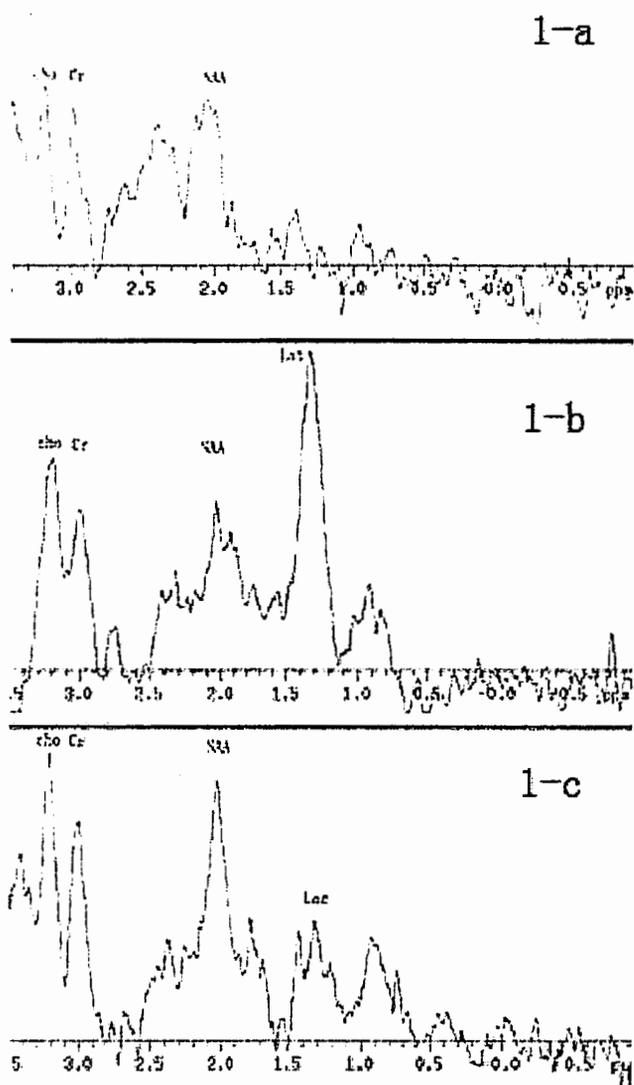


Fig1 海馬倍領域のMRS。1-aは正常ラットの画像、1-bは心肺蘇生5時間後の画像、1-cは骨髄幹細胞移植後の画像。

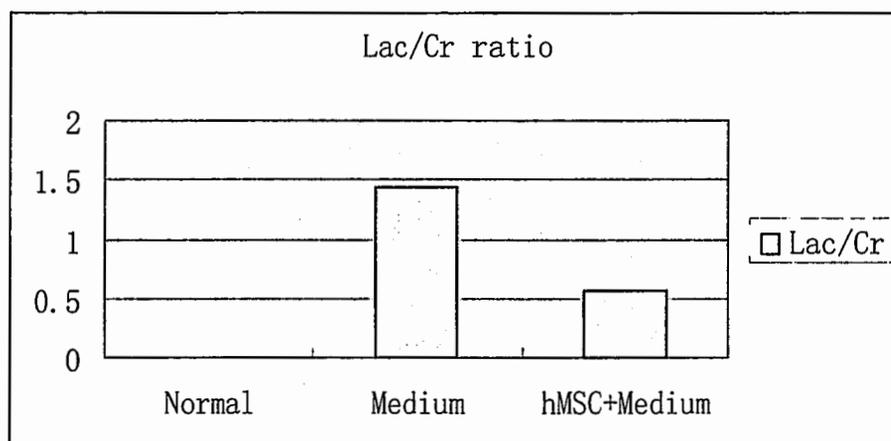


Fig2 正常ラット、心肺蘇生コントロール群と骨髄幹細胞移植実験群のLac/Cr Ratio。

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 米熱古麗 買買提



指導責任者名： 藤枝 憲二 職名： 教授

所属機関名： 旭川医科大学小児科学講座

〒 078-8510

所在地： 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

電話： 0166-68-2481 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

中国人低身長患者における成長ホルモン受容体の変異解析

3. 成果の概要 (100字程度)

Growth hormone receptor (GHR) において、Exon3を有するか (GHRfl) あるいは欠失するか (GHRd3) という多型が知られている。漢民族49名とウイグル民族23名および日本人52名の低身長者を対象にGHR多型を解析した。GHRfl/GHRfl、GHRfl/GHRd3、GHRd3/d3の割合はそれぞれ、漢民族では56%、40%、4%、ウイグル民族では72%、18.2%、9%、日本人では83.7%、14.3%、2%であった。以上から、漢民族はウイグル民族、日本人よりもGHRd3頻度が高いが、Caucasianよりは低いことが分かった。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

中国人低身長患者における成長ホルモン受容体の変異解析

研究者氏名	米熱古麗 買買提
中国所属機関	新疆医科大学第一付属病院小児科
日本研究機関	旭川医科大学小児科学講座
指導責任者	教授 藤枝 憲二
共同研究者名	向井徳男、上田修、松尾公美浩、鈴木滋

Abstract

Exon 3 insertion or deletion is one common polymorphism in the growth hormone receptor (*GHR*) of humans. Deletion of exon 3 has been associated with the degree of height increase in response to GH therapy. The objective of the study was to evaluate the proportion of *d3/f1-GHR* polymorphism genotypes in Chinese 72 Short stature Han and Uighur patients compare with Japanese 52 *GHR* genotypes. The Chinese Han group was classified into *GHRf1/GHRf1* (56%) *GHRf1/GHRd3* (40%) and *GHRd3/GHRd3* (4%) based on genotypes of *GHR*-exon3. Genotypes of the Uighur group and Japanese Group consisted of 72%, 83.7% with *GHRf1/GHRf1*, 18.2%, 14.3% with *GHRf1/GHRd3* and 9%, 2% with *GHRd3/GHRd3* respectively. The proportion with *GHRf1/GHRd3* exon3 genotype in Chinese Han nation was found to be higher than Chinese Uighur and Japanese genotype but lower than that in European people was with significant statistically.

Keywords: Growth hormone receptor, polymorphism, short stature, Chinese, different races.

Introduction

The human *GHR* gene is a single copy gene that spans 300 kb of chromosome 5. It contains nine coding exons that encode the receptor and several additional exons in the 5-prime untranslated region. (1) A polymorphism the human GH receptor gene (*d3/f1-GHR*) resulting in genomic deletion of exon 3 (2, 3). Recently associated with the degree of height increase in response to GH therapy in short French children born small for gestational age (SGA) or with idiopathic short stature (4), German Turner syndrome patients (5), and Brazilian GH-deficient children (6), although other studies found no such association (7, 8). However, a significant association between *GHRd3* genotype and hypertension have been demonstrated, lacking a copy of the *GHRd3* alleles to be a risk factor for hypertension has been reported (9). At the present the common polymorphism of *GHR* is as yet not documented statistically Xinjiang of China. In an attempt to understand the polymorphism change of exon3 in *GHR*-gene in my area we examined 72 Chinese-Han and Uighur ethnic (totally deferent with main Han nation) compared to 52 Japanese sample genotype.

Materials and methods

Subjects

A total of 72 Chinese Short stature patient live in Xinjiang (biggest minority area in

China) aged 2-15 (Uighur boy 11, Han boy 31, Uighur girl 12, Han girl 18); were recruited from June 2006 to October 2006. Participate in this study. Twenty-four were living rural area in XinJiang, twenty hospitals participated, 28 from out patient. Inclusion criteria were: height lower than 3% of normal, never having been treated with GH or other anabolic agents; normal gastrointestinal, pulmonary, and liver function;. Exclusion criteria were: neonatal brain injury, chronic diseases, and steroid therapy. None were in an acute care situation. Height and weight were recorded by our-self at inclusion and the corresponding heights SDS were calculated. Serum IGF-I were measured at entry into the study in 41boys and 31girls and expressed as SDS according to age- and sex-matched controls and the ratio IGF-I calculated (Table 1).

Table1.Height, IGF-1 date in the Chinese short Children

	Uighur Patient	Han Patient
Age	11.3±2.7	8.9±3.1
Height-SDS	-3.17±0.43	-2.93±0.93
IGF-1-SDS	-1.07±1.01	-0.89±1.34

Genotyping

Genomic DNA was extracted from white blood cells of patient and Patient's mother using a PUREGENE DNA Purification Kit (Gentra) and used as template DNA (Figure1).

Figure1: 72 template DNA in short stature from XinJiang



To determine genotype of *GHR* exon 3, we applied one revised polymerase chain reaction (PCR)-based assay method.⁹ The pair of primers G1 (5' -GTTGGTCTGCTGGTCT GCTT-3') and G3 (5' -GTGCTCTGCTAAGGATAGC TG-3') allowed amplification of the exon 3 allele only, whereas primers G1 and G2 (ACTTTAGCCAGTCGT TCCTG) amplified *GHRd3* allele under specific conditions thereby discriminating the three possible alleles in this locus (i.e. homozygous of *GHRf1/f1*, *GHRd3/d3* and combination heterozygous *GHRf1/d3*) (Fig. 1a). Parameters of PCR were the initial step of 5 min at 94° C, followed by 35 cycles consisting of 30 s at 94° C, 30 s at 55° C, 1 min 30 s at 72° C, and the last extension of 5 min at 72° C. The expected length of 934 bp indicates the *GHRf1* allele and 532 bp indicates the *GHRd3* allele (Figure2)

Figure 2



Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated according to standard procedures using χ^2 analysis. Differences for *d3/f1*-GHR genotype frequencies between three groups and height-SDS groups were analyzed by the χ^2 test.

Results

Similar proportion for the GHRf1/GHRf1 and GHRf1/GHRd3 genotypes was found in both Japanese group and Chinese Uighur group. In the Uighur group *d3/d3* genotype was higher and did reach statistical significance. Mean values of Uighur group height-SDS were lower than Han groups (although not statistically significant). The proportion of *d3/f1*-GHR genotype in Chinese Han group was higher than Japanese group and Chinese Uighur group but lower than European people did reach statistical significance. (Table 2)

Table 2. *d3*-GHR genotypes (%) in Chinese-Japanese short stature patient

	Japanese	Chinese Han nation	Chinese Uighur nation
<i>d3/d3</i>	2	4	9
<i>d3/f1</i>	14.7	40	18.2
<i>f1/f1</i>	83.7	56	72.7

IGF-I-SDS lower in Uighur group than Han group although not statistically significant, was observed.

Discussion

Growth hormone is used to increase height in short children who are not deficient in growth hormone, but its efficacy varies widely across individuals. In which genetic disposition, nutrition, homeostasis, hormones, and growth factors interact. Among these factors, GHR plays an important role, and loss-of-function mutations in the GHR gene lead to growth delay during infancy, childhood, and adolescence and short stature in adulthood (10-12).

There are 2 isoforms of GHR in humans, generated by retention or exclusion of exon 3 during splicing: a full-length isoform and an isoform that lacks exon 3 (*d3*-GHR). The generation of 2 transcripts that differ by the skipping of a coding exon results from homologous recombination, which mimics alternative splicing between the 2 retroviral sequences that flank the skipped exon (13). The allele encoding *d3*-GHR is specific to humans. Results of the studies (14) supported the hypothesis that the GHRd3 isoform is transcribed from a GHR allele carrying a genomic deletion of exon 3 rather than by alternative splicing. An isoform of the growth hormone receptor gene that lacks exon 3 (*d3*-GHR) was associated with 1.7 to 2 times more growth acceleration induced by growth hormone than the full-length isoform (15) (P less than 0.0001). In transfection experiments, the transduction of growth hormone signaling through *d3*-GHR homo- or heterodimers was approximately 30% higher than through full-length GHR homodimers (P less than 0.0001). Thus, the polymorphism in exon 3 of GHR is important in growth hormone pharmacogenetics. Dos Santos et al. (2004) stated that one-half

of Europeans are heterozygous or homozygous with respect to the allele encoding the d3-GHR isoform, which is dominant over the full-length isoform. In our study the proportion of GHRf1/GHRf1, GHRf1/GHRd3, GHRd3/GHRd3 genotype in Short stature Chinese Uighur group differ statistically and significantly from those Short stature Chinese Han group. This date suggest that in addition to the multiple factors that may contribute to short stature in Uighur group. In a summary, our date showed significant differences in the proportion of the d3-GHR polymorphism genotypes between Japanese groups, Chinese Uighur group with Chinese Han group. In addition Further investigate will be need to investigate polymorphism of GHR-gene in normal height control populations in my area and compare with this date.

References

- 1 Godowski, P. J.; Leung, D. W.; Meacham, L. R. et al (1989) Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86: 8083-8087
- 2 Argetsinger LS, Carter-Su C (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev.* 76: 1089-1107.
- 3 Clark B. (1997) The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of hopoiesis and immune function. *Endocr Res.* 18: 157-179.
- 4 Herrington J, Carter-Su C. (2001) Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinal Metab.* 12: 252-257.
- 5 Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 6736-6741.
- 6 Quarrie JK, Riabowol KT. (2004) Murine models of life span extension. *Sci Aging Knowledge Environ.* 31: re5.
- 7 Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG et al (1997) A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13215-13220.
- 8 Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL. (2000) Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP genedisrupted mice. *Endocrinology* 141: 2608-2613.
9. Horan, M.; Newsway, V.; Yasmin, (NI) et al (2006) Genetic variation at the growth hormone (GH1) and growth hormone receptor (GHR) loci as a risk factor for hypertension and stroke. *Hum. Genet.* 119: 527-540
10. Goddard AD, Covello R, Luo SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, Rundle AC, Wells JA, Carlsson LM (1995) Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *N Engl J Med* 333:1093-1098
11. Sanchez J, Perera E, Baumbach L, Cleveland W (1998) Growth hormone receptor gene mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4079-4083
12. Rosenfeld RG, Hwa V (2004) New molecular mechanism of GH resistance. *Eur J Endocrinol* 151(Suppl 1):S11-S15
- 13 Pantel, J.; Machinis, K.; Sobrier, M.-L. et al (2000) Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during

primate evolution: a novel mechanism accounting for protein diversity between and within species. J. Biol. Chem. 275: 18664-18669

14. Pantel, J.; Grulich-Henn, J.; Bettendorf, M. et al (2003) Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. J. Clin. Endocr. Metab. 88: 1705-1710

15. Dos Santos, C.; Essioux, L.; Teinturier, C et al (2004) A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. Nature Genet. 36: 720-724

作成日 : 2007 年 3 月 14 日

財団法人日中医学協会
2006年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2007 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 黄 明国 

指導責任者名： 江口 勝美  職名： 教授

所属機関名： 長崎大学第一内科

〒 852-8501

所在地： 長崎市 坂本 1-7-1

電話： 095-849-7262 内線： 7270

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

Granzyme B による細胞内の La(SS-B) 分子の変化 

3. 成果の概要 (100字程度)

我々は一部のシェーグレン症候群患者血清中にはグランザイムBによって特異的に切断される N末端フラグメントに対する新しい自己抗体が存在することを報告した。今回の研究で我々はpAcGFP1-c2ベクターを利用して、GFP-La と GFP-LaΔ220 (グランザイムBによって切断されるN末端フラグメント)融合蛋白を作成し、蛍光顕微鏡でLa (SS-B) の変化を確認した。また、ウェスタンブロット法でグランザイムBによって切断されたLa (SS-B) 分子の細胞核と細胞質での発現を比較した。今回の実験で、La (SS-B) 分子がグランザイムBによって引き起こされるアポトーシスの中で、特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動することを明らかにした。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ 有 (学会名・演題)

第50回日本リウマチ学会総会・学術集会

演題名 Granzyme Bによる細胞内のLa(SS-B)分子の変化

(2) 発表した論文 無 ・ 有 (雑誌名・題名)

自己抗原 La (SS-B) は Granzyme B によるアポトーシスの中で特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動する

研究者氏名 黄 明国

中国所属機関 牡丹江市疾病予防コントロールセンター

日本研究機関 長崎大学付属病院第一内科

指導者氏名 教授 江口 勝美

共同研究者名 井田弘明、有馬和彦

要旨

私たちは近頃一部のシェーグレン症候群患者の血清中には、La (SS-B) 自己抗原がグランザイム B によって特異的に切断されて新しい自己抗体を産生していることを報告している。でも、グランザイム B による細胞核内の La (SS-B) の変化については詳細は不明な点が多い。今回我々はグランザイム B によるアポトーシスの中で自己抗原 La (SS-B) の変化を明らかにすることを目的にした。まず、pAcGFP1-c2 ベクターを利用して GFP-La と GFP-La Δ 220 (グランザイム B によって特異的に切断される N 末端部分) 融合蛋白を作成した。また、その融合蛋白を発現する A293T 細胞を細胞障害性細胞 (CTL 細胞) と混合培養し、免疫染色、免疫プロット法で切断された GFP-La 融合蛋白を確認した。同様の方法で、唾液腺細胞株 HSG 細胞を使って細胞核内の La (SS-B) の変化を確認した。A293T 細胞内で、GFP-La は核内に局在し、GFP-La Δ 220 は細胞質内に存在していた。CTL 細胞のグランザイム B 刺激で、A293T 細胞内の GFP-La は切断されて細胞質に移動していた。HSG 細胞を使った実験でも同様の結果が認められた。このような結果は、シェーグレン症候群ではグランザイム B が引き起こすアポトーシスによって細胞核内の La (SS-B) 自己抗原が特異的に切断されて細胞質に移動し、結果的に新しいエпитプに対する自己抗体が産生する可能性が示唆された。

Key words グランザイム B, La (SS-B) 自己抗原、アポトーシス、自己抗体、シェーグレン症候群、

緒言

La (SS-B) 分子は主にほとんどの真核細胞核内に存在し、ポリメラーゼ III に結合し、その転写に重要な働きをしている (1)。抗-La (SS-B) 自己抗体はシェーグレン症候群、ルプスなど自己免疫疾患に現れて、新生児心ブロックなどに関わっている (2, 3)。

グランザイム B は主に NK 細胞、細胞障害性細胞 (CTL 細胞) などの顆粒内に存在し、標的細胞内のプロカスペーゼをカスペーゼに活性化させて、感染免疫、癌免疫において重要な役割を果た

す (4)。また、グランザイム B は直接標的細胞内の重要な蛋白を切断する (4-6)。我々は一部のシェーグレン症候群患者血清中にはグランザイム B によって特異的に切断される N 末端 La (SS-B) フラグメントに対する新しい自己抗体が存在することを報告した (7)。これらの結果は、NK 細胞、CTL 細胞によるアポトーシスは自己抗体の産生に何らかの関わりがあることを示唆している。今回はグランザイム B が引き起こすアポトーシスの中で La (SS-B) 分子の細胞内の変化を明らかにすることを目的にした。

今回の研究で我々は pAcGFP1-c2 ベクターを利用して、GFP-La と GFP-La Δ 220 (グランザイム B によって切断される N 末端フラグメント) 融合蛋白を作成した。その融合蛋白を発現している A293T 細胞を CTL 細胞株 YT 細胞と混合培養し、蛍光顕微鏡で La (SS-B) の変化を確認した。また、ウェスタンブロット法でグランザイム B によって切断された La (SS-B) 分子の細胞核と細胞質での発現を比較した。この一連の実験で、La (SS-B) 分子がグランザイム B によって引き起こされるアポトーシスの中で、特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動することが確認された。これによって、NK、CTL 細胞による唾液腺細胞のアポトーシスがシェーグレン症候群の自己抗体の産生に関連していることが示唆された。

材料と方法

細胞と培養

6 ウェル細胞培養器具にて、A293T 細胞 (ATCC) は 10% FCS を含む DMEM (ドイツ) で、HSG 細胞 (Yoshio Hayashi 先生、徳島大学歯学部) は 10% FCS を含む RPMI で培養した。YT 細胞 (ATCC) は 10% FCS を含む RPMI を使用して、浮遊系細胞培養器具で培養した。

GFP-La と GFP-La Δ 220 融合蛋白の発現

La (SS-B) cDNA (Dr. Walther Van Venrooij, University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands) の全長または N 末端から 660bp の部分に PCR をかけて増幅した。この PCR 産物を GFXTM DNA 精製キット (Amersham) を利用して精製し、ゲル電気泳動で確認した。また、その塩基配列をシーケンサで確認し、pAcGFP1-c2 ベクターの EcoR1 と BamHI サイトにサブクローニングした。A293T 細胞を 6 ウェルプレートに培養し、 5×10^4 /ウェルになった時 3 μ l DNA/ウェルの比率で、リポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を使用して遺伝子導入して GFP-La, GFP-La Δ 220 を発現させた。

細胞障害性実験

YT 細胞による細胞障害性実験は以前に発表した (7) ように、 1×10^5 YT 細胞と接着系細胞 HSG 細胞または A293T 細胞を同じ細胞数比率で共培養した。反応 3h, 6h, 12h, 24h 後、浮遊系の YT 細胞は捨て、プレートは 1 \times PBS で 2 回洗った。これを用いてウェスタンブロット又は細胞染色を行った。

ウェスタンブロット法

サンプルを 12.5% SDS-PAGE (ATTO, Japan) にアプライする。電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、5% スキムミルク PBS でブロッキングした。その膜を抗-La (SS-B) MAb SW5, 抗-PARP MAb c-2-10 (MBL), 抗-DFP MAb (MBL), 抗-GFP MAb JL-8 (Clontech) など一次抗体で 1h 反応

させた。10 分間×3 回 0.5% Tween PBS で洗い、HRP-ラベルした抗マウス抗体 (MBL) で反応後、ECL プラス (Amersham) で増幅し、フィルムに感光させた。

免疫沈降

GFP-La, GFP-La Δ 220 形質転換 A293T 細胞の無細胞系をサイズ真核細胞免疫沈降キット (PIRCE) を使用して抗-La MAb SW5 で免疫沈降し、沈降産物を抗-GFP MAb JL-8 と反応させた。

免疫染色

HSG 細胞をスライドグラスが入っている 24-ウェルプレットに培養する。HSG 細胞を 70% エタノールで 15 分間固定し、BSA が入っている PBS で 15 分間浸す。これを室温で 1h 抗-La MAb SW5 で反応させた後、FITC-ラベルした抗マウス IgG と反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

1) GFP-La と GFP-La Δ 220 融合蛋白は A293T 細胞で異なるパターンを示した。

La (SS-B はグランザイム B によって Asp-220 のサイトで特異的に切断されて 27 KDa のフラグメントが産生した (4, 5, 7)。細胞核内の La(SS-B) 分子の変化を明らかにするために、我々は pAcGFP1-c2-La と pAcGFP1-c2-La Δ 220 サブクローニングベクターを構築した。制限酵素 EcoR1 と BamHI で処理すると 1227 bp の La cDNA の ORF と 660 bp の N 末端フラグメントが出現した (Fig. 1B レン 3, 4)。また、それぞれサブクローニングしたベクターを形質転換させた A293T 細胞の無細胞系を抗-GFP MAb JL-8 で反応させた。結果、75 KDa GFP-La 融合蛋白 (レン 6, 9)、53KDa GFP-La Δ 220 融合蛋白 (レン 7, 10)、28KDa GFP 蛋白が確認された。これは GFP 融合蛋白が A293T 細胞内で機能的に発現していることを表している。蛍光顕微鏡で確認したところ、GFP-La 融合蛋白は細胞核内に、GFP-La Δ 220 融合蛋白は細胞質内に、GFP 蛋白は細胞内で均一な分布を示していた。

2) GFP-La はグランザイム B 特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動した。

GFP-La 融合蛋白を恒常的に発現している A293T 細胞と CTL 細胞株 YT 細胞を時間依存的に共培養し、ウェスタンブロット法と蛍光顕微鏡で GFP-La 融合蛋白の局在を確認した。ウェスタンブロット法ではグランザイム B 処理した A293T 無細胞系と同じサイズの GFP-La フラグメントが抗-La MAb SW5 で確認された。同時に、細胞核と細胞質分画を SW5 で反応させた結果、そのフラグメントは細胞質内で確認された。蛍光顕微鏡法でも反応時間につれて、蛍光蛋白の細胞質への移動が確認された。(Fig. 2)。

3) HSG 細胞と YT 細胞の共培養においてもグランザイム B 特異的に切断された 27KDa フラグメントが細胞質に移動した。

より明確な証拠を得るために、唾液腺細胞株 HSG 細胞を YT 細胞と共培養し、La 蛋白の変化を確認した。グランザイム B 特異的な 27KDa フラグメントは抗-La MAb SW5 によって確認された (Fig. 3a)。同様に、YT 細胞と反応させた後、HSG 細胞を抗-La MAb SW5 で反応し、また FITC ラベルした抗マウス IgG 二次抗体で反応し、蛍光顕微鏡で観察した。27KDa La フラグメントが時間依存的に細胞質に移動していることが確認された (Fig. 3b)。

考察

今回の研究で我々は細胞核内の La (SS-B)分子がグランザイム B 特異的に切断されて、その 27KDa N 末端フラグメントは細胞質に再分布していることを明らかにした。我々は以前の研究で一部のシェーグレン症候群患者血清を使って、グランザイム B 特異的に切断される 27KDa La フラグメントに新しいエピトプが産生することを報告した (7)。しかし、このような新しい自己抗体の産生メカニズムに関してはよく分からないところが多い。今回の研究で示したように、La (SS-B) 蛋白がグランザイム B 特異的に切断されて細胞核から細胞質に移動する現象は、27KDa フラグメントに対する新しい自己抗体の産生に関与しているかもしれない。

参考文献

- [1] R. J. Maraia, and R. V. Intine. *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 367-379.
- [2] C. Vital, HM. Moutsopoulos, S. Bombardieri. *Ann Rheum Dis.* 53 (1994) 637-647.
- [3] P. Gordon, MA. Khamashta, E. Rosenthal, JM. Simpson, G. Sharland, A. Brucato, et al. *J. Rheumatol.* 31 (2004) 2480-2487.
- [4] PJ. Utz, TJ. Gensler, P. Anderson. *Arthritis Res.* 2 (2001) 101-114.
- [5] LA. Casciola-Rosen, F. Andrade, D. Ulanet, W. Wong, A. Rosen. *J. Exp Med.* 190 (1999) 815-826.
- [6] F. Andrade, S. Roy, D. Nicholson, et al. *Immunity.* 8 (1998) 451-460.
- [7] M. Huang, H. Ida, M. Kamachi, N. Iwanaga, Y. Izumi, F. Tanaka, K. Aratake, K. Arima, M. Tamai, A. Hida, H. Nakamura, T. Origuchi, A. Kawakami, N. Ogawa, S. Sugai, P.J. Utz, and K. Eguchi. *Clin. Exp Immunol.* 142 (2005) 148-154.
- [9] J.M. Ger, R.L. Pruijn, W.J. Van venrooij. *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5173-5180.
- [10] SJ. Martin, GP. DD. Newmeyer, S. Mathias et al. *EMBO. J.* 14 (1995) 5190-5200.

注：本研究は 2006 年 4 月 23 日「第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会」にて口演発表、[FEBS LETTERS] に投稿中

作成日：2007 年 3 月 10 日

Fig 1

La(SS-B)蛋白を pAcGFP1-C2に組み込み、A293T細胞に発現させた

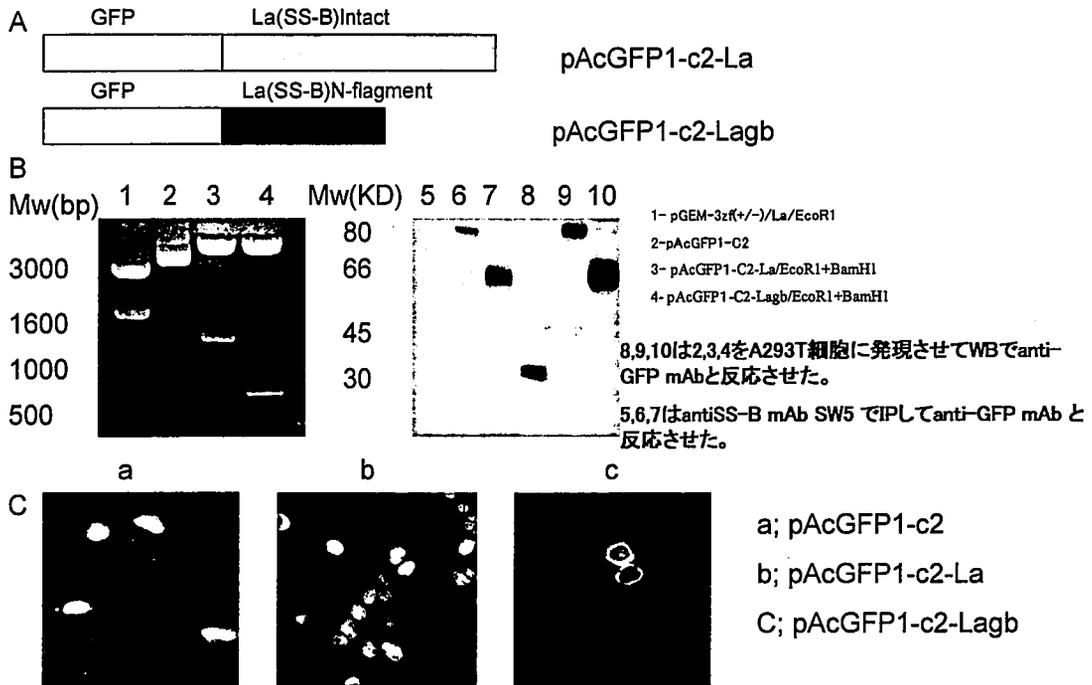


Fig 2

pAcGFP1-C2-La transfection A293T細胞とYT細胞とのCo-cultureにおいて細胞質と細胞核でのLa(SS-B)分子の発現の比較

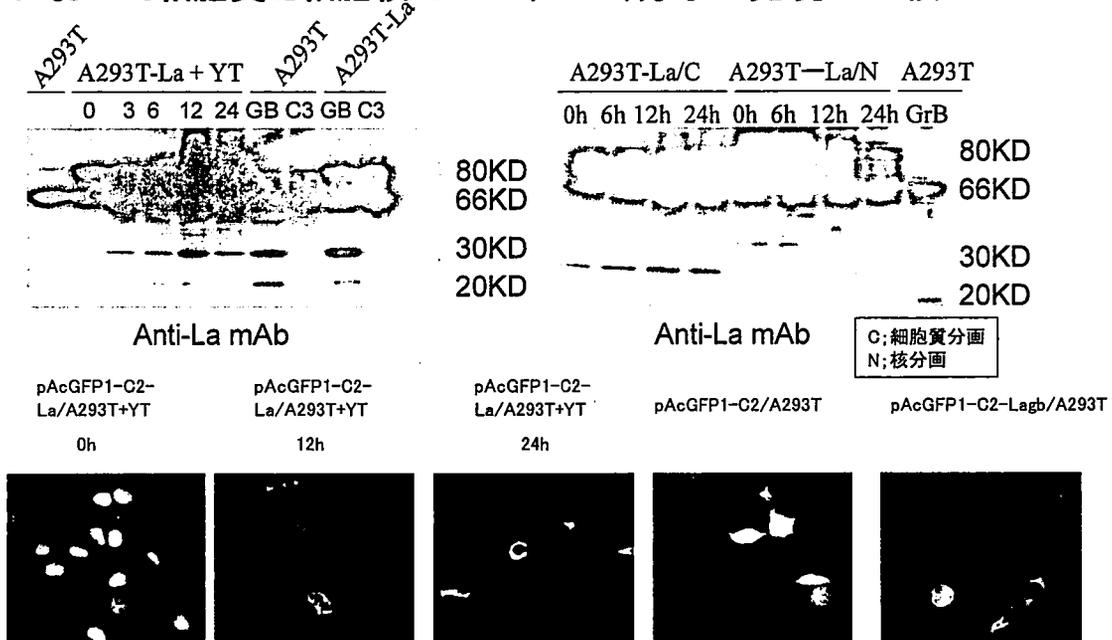
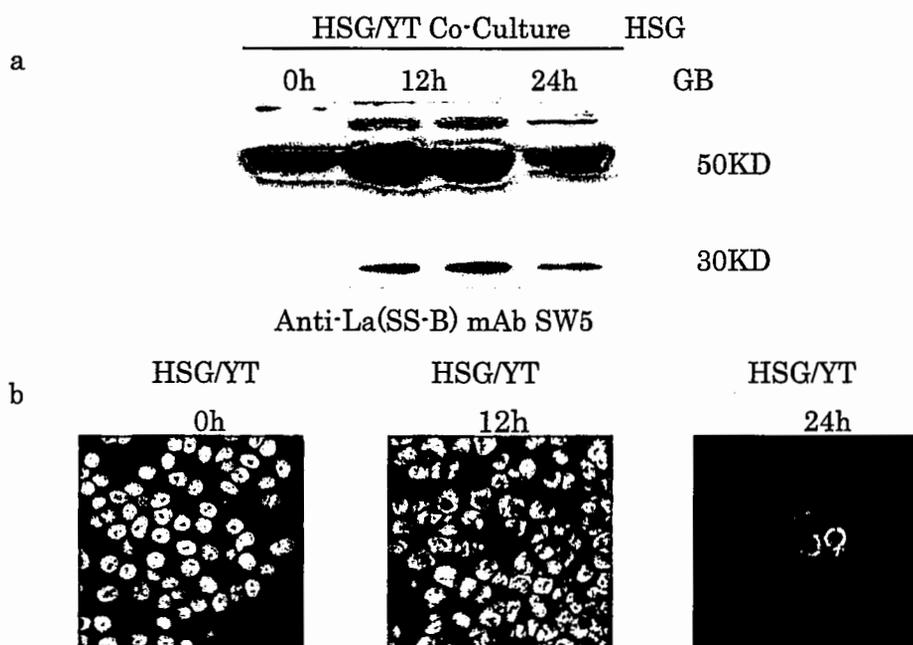


Fig 3

HSG細胞とYT細胞との混合培養においてLa(SS-B)蛋白は核から細胞質へ移動した



HSG細胞とYT細胞を時間依存的に共培養し、anti-La mAb SW5で反応した後、FITC anti-mouse IgGで反応させた。